



Ciências
ULisboa

**Distribuição dos recursos metabólicos entre proliferação e
manutenção celular: um estudo em tempo real e in vivo por
calorimetria em *Saccharomyces cerevesiae***

Miguel Alves Rendas

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

Dissertação orientada por:
Fernando José Nunes Antunes
Manuel Eduardo Minas da Piedade

Agradecimentos

Depois de um ano de intenso trabalho no laboratório, chega o dia em que o resultado é concluído na forma desta Tese. Este foi um ano intenso, durante o qual julgo ter aprendido bastante, não só na área científica em que se insere esta Tese, mas fundamentalmente no que é trabalhar “a sério” atrás da bancada, e viver os “dramas” e “desilusões” de quando as coisas correm mal e a satisfação de quando correm bem. Neste contexto, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram ao longo deste ano.

Em primeiro lugar gostaria de expressar a minha gratidão aos meus orientadores Fernando Antunes e Manuel Minas da Piedade pelos seus comentários e ideias, pelas suas observações e outras preciosas ajudas constantes ao longo deste último ano, que me permitiram construir este trabalho.

Além dos orientadores que acompanharam o meu trabalho, queria agradecer ainda a todos os integrantes do grupo de biologia *redox* da FCUL, sobretudo à professora Luísa Cyrne que, apesar de não ter qualquer obrigação, sempre se mostrou disponível e acessível para ajudar. Dos colegas do grupo gostava de realçar o Rafael Bento, o meu antecessor na calorimetria, por todos os conselhos e dicas sobre o calorímetro, assim como pelas discussões sobre os resultados desta Tese.

Claro que não me poderia esquecer de agradecer ainda a todos os meus colegas do grupo da calorimetria, com destaque para: o Carlos Bernardes, devido à sua “perícia” e criatividade em resolver todos os problemas que surgiram com o calorímetro; a professora Soli, que, também, sem qualquer obrigação, sempre se mostrou interessada e ajudou na análise da cinética de hidrólise do metilparabeno.

Por último, mas não menos importante, gostaria ainda de agradecer à minha família: aos meus pais e irmão, assim como à minha Vânia (que para mim é família); e amigos na instituição, sobretudo à Joana Figueiredo; pelo apoio que proporcionaram nesta etapa da minha via, facilitando a escrita desta Tese.

Resumo

A *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), usada tradicionalmente na produção de bebidas alcoólicas e pão, é um organismo unicelular eucariota que partilha a maioria dos processos e funções de eucariotas superiores, apresentando ainda um crescimento rápido em meio líquido. Isto torna a *S. cerevisiae* um dos modelos mais simples e práticos para o estudo de células eucariotas. Além disso, o metabolismo respiro-fermentativo da *S. cerevisiae* durante a fase de crescimento exponencial apresenta semelhanças com o “efeito de Warburg”, observado em algumas células com proliferação rápida, como as células cancerosas. Esta semelhança, torna a *S. cerevisiae* um modelo interessante para o estudo do metabolismo das células cancerosas, destacando a importância vital do estudo do metabolismo da *S. cerevisiae*.

A *S. cerevisiae* é um organismo bastante versátil, tendo a capacidade de adaptar o seu metabolismo e taxa de crescimento em resposta a alterações no meio de cultura, tal como a disponibilidade de nutrientes, e situações de *stress*, tais como *stress* oxidativo ou fome. Elevados níveis de oxidantes, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), criam uma situação de elevado *stress* oxidativo caracterizada por extensas lesões celulares, apesar de doses baixas deste oxidante estarem associadas a efeitos de sinalização intracelular e poderem induzir uma resposta adaptativa nas células, protegendo-as de um possível *stress* posterior. Assim, o H_2O_2 consegue modular o metabolismo de forma dependente da sua concentração.

O objetivo geral desta Tese foi estudar a dinâmica do metabolismo da *S. cerevisiae* na resposta a diferentes meios de cultura e ao H_2O_2 . A microcalorimetria de fluxo foi a ferramenta central desse estudo, permitindo seguir em tempo real a energia dissipada por todas as reações que têm lugar na célula. Porque todas as reações bioquímicas que acontecem na célula são acompanhadas por transferências de calor, as medidas calorimétricas são um bom indicador da atividade metabólica. Além de ser uma técnica extremamente sensível, a microcalorimetria apresenta diversas vantagens sob outros métodos, uma vez que permite medidas em tempo real e não é invasiva nem destrutiva.

Neste trabalho, a questão da natureza uniforme ou dinâmica do metabolismo de *S. cerevisiae* ao longo da fase exponencial foi investigada através de microcalorimetria de fluxo e de medidas auxiliares como densidade celular, consumo de oxigénio e consumo de glucose. Isto envolveu acompanhar o crescimento da *S. cerevisiae* em diferentes meios de cultura e situações de *stress*, nomeadamente *stress* oxidativo. Ao contrário de estudos anteriores, em que foram utilizadas estirpes prototróficas, este trabalho baseou-se numa estirpe auxotrófica (BY4741) amplamente usada atualmente em estudos laboratoriais por ser a estirpe *wild-type* da coleção de mutantes de *S. cerevisiae*.

Observou-se que a potência dissipada, P , associada à atividade metabólica celular depende significativamente do meio de cultura utilizado. Estudos de crescimento realizados com glucose a 2% em dois meios de cultura diferentes, nomeadamente, um meio composto por extrato de levedura (*yeast extract*), peptona e dextrose (YPD) e um meio sintético completo (SC) mostraram que a potência máxima dissipada pela BY4741 durante a fase exponencial é consideravelmente mais elevada no meio rico YPD ($662 \pm 11 \mu\text{W}$ ($n=4$)) do que no meio menos rico SC ($365 \pm 17 \mu\text{W}$ ($n=5$)). Os perfis das curvas calorimétricas referentes aos dois meios são também diferentes. Em YPD a potência dissipada pela BY4741 aumenta exponencialmente até se atingir um máximo, diminuindo, em seguida, abruptamente para o valor estacionário típico das células em fase estacionária. Em meio SC observam-se dois máximos: o primeiro, é causado pela depleção do aminoácido auxotrófico metionina no meio de cultura; o segundo é semelhante ao observado no meio YPD, sendo também seguido de uma diminuição rápida de potência para valores típicos da fase estacionária. Estes resultados evidenciam a incapacidade do meio SC, amplamente utilizado na seleção de mutantes auxotróficos, para proporcionar um crescimento exponencial sem constrangimentos.

A análise das curvas de crescimento revelou que, independentemente do meio de cultura, a potência dissipada por célula é máxima durante a transição entre as fases *lag* e exponencial, sendo o valor atingido em meio SC superior ao observado no meio YPD. Isto indica que a atividade metabólica é máxima na transição entre estas duas fases e mais elevada no meio mais pobre (SC). O perfil de consumo de O_2 sugere que a diminuição contínua da potência por célula durante a fase exponencial, pode ser devida a uma diminuição contínua do metabolismo respiratório, sendo que este tipo de metabolismo tem uma entalpia associada muito superior à do metabolismo fermentativo.

De forma a otimizar as condições de exposição da *S. cerevisiae* ao H_2O_2 , investigaram-se os efeitos de diferentes doses deste oxidante na respetiva curva calorimétrica de crescimento. Observou-se um efeito hormético do H_2O_2 à concentração de $150 \mu\text{M}$, evidenciado por um aumento de P imediatamente após a adição de H_2O_2 , contrastando com a diminuição observada para concentrações superiores ($0.3 - 1.0 \text{ mM}$), possivelmente devido a morte celular. Para as concentrações mais elevadas observou-se ainda uma paragem temporária da curva calorimétrica após a exposição ao H_2O_2 .

A fim de definir os efeitos de condições de elevado *stress* oxidativo na capacidade proliferativa de culturas de *S. cerevisiae* em crescimento exponencial, analisou-se a viabilidade celular de culturas expostas a uma dose letal (1 mM) de H_2O_2 ao longo do tempo. Observou-se que a cinética de morte da *S. cerevisiae* segue um decaimento exponencial bifásico: a primeira fase é observada imediatamente após a adição de H_2O_2 e tem uma duração de aproximadamente

3h; a segunda fase inicia-se após a população se ter adaptado a elevadas concentrações de H_2O_2 , tornando-se mais resistente, e é evidenciada por uma diminuição do número de células mortas por unidade de tempo, para a mesma concentração de 1 mM. O mesmo protocolo usando células previamente adaptadas a uma dose subletal de H_2O_2 produziu resultados semelhantes, o que é indicativo de que mesmo células adaptadas a doses subletais de H_2O_2 necessitam de mais adaptação para conseguir sobreviver em condições de maior *stress* oxidativo. A adaptação com doses subletais de H_2O_2 diminuiu a morte celular na população reduzindo a duração da primeira fase, i.e. menos tempo necessário para que as células se conseguissem adaptar à dose letal de H_2O_2 . Interessantemente, as células conseguiram retomar o crescimento exponencial mesmo na presença de tais concentrações elevadas de H_2O_2 , implicando uma capacidade aprimorada de lidar com o *stress* oxidativo por parte das células.

Curiosamente, o mutante ZWF1 Δ , deletado para o enzima 6P-glucose desidrogenase (G6PDH), revelou-se extremamente resistente ao *stress* oxidativo, evidenciado por uma primeira fase pós adição de H_2O_2 bastante curta e uma segunda fase com uma taxa de morte celular muito baixa. Além do mais, o típico protocolo de adaptação ao H_2O_2 , nesta estirpe não surte qualquer efeito ao nível da sobrevivência. Contudo, esta estirpe apenas consegue retomar o crescimento exponencial depois de todo o H_2O_2 no meio ter sido consumido. No mutante ZWF1 Δ , a produção de NADPH encontra-se drasticamente afetada devido à ausência do G6PDH, que é o primeiro enzima da via dos fosfatos de pentose (PPP), principal via de formação de NADPH. Em conjunto, os resultados obtidos para as duas estirpes sugerem um papel central da via PPP na resposta antioxidante a doses letais de H_2O_2 .

Foi estudado o efeito de doses não letais de H_2O_2 no metabolismo de culturas de *S. cerevisiae* em crescimento exponencial, através de 3 adições *bolus* de 150 μM H_2O_2 . A potência dissipada pela população aumentou ligeiramente imediatamente depois de cada uma das adições, possivelmente como resultado de um aumento do catabolismo associado à atividade dos enzimas antioxidantes. As 3 adições *bolus* de H_2O_2 produziram um aumento de cerca de 14% na entalpia associada ao metabolismo da cultura de *S. cerevisiae* até ao primeiro máximo da curva calorimétrica em meio SC. Este aumento não se deveu apenas à exposição ao H_2O_2 , mas também à fome de metionina, uma vez que o H_2O_2 não produziu qualquer alteração na entalpia do metabolismo em culturas a crescer em meio extra suplementado em metionina e outros aminoácidos, onde a limitação de metionina é eliminada.

Durante este trabalho, um novo método de doseamento de glucose foi desenvolvido. Este método revelou ser altamente específico para a glucose e consiste na reação do glucose oxidase (GO) com a glucose presente na amostra, consumindo O_2 no processo. Este consumo foi quantificado num elétrodo de O_2 e relaciona-se proporcionalmente com a concentração de glucose

da amostra. Este método apresenta uma gama de linearidade larga, indo dos 0 μM aos 260 μM de glucose.

No geral, o trabalho microcalorimétrico levado a cabo nesta Tese veio confirmar e alargar observações anteriores de que as alterações metabólicas que ocorrem ao longo da fase exponencial favorecem a glicólise aeróbia em função da respiração mitocondrial. Observou-se também que o metabolismo da *S. cerevisiae* é bastante dependente do meio de cultura e dos nutrientes que integram o meio para além da fonte de carbono. Foi ainda detetado um efeito de hormese a uma baixa concentração de H_2O_2 (150 μM) e demonstrou-se que o H_2O_2 em doses letais mata as células de uma forma bifásica.

Palavras-chave: H_2O_2 , metabolismo, microcalorimetria, fome, *S. cerevisiae*

Abstract

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), used traditionally in the making of brewers and baking, is a eukaryotic unicellular organism that shares most of the biologic processes and functions of higher eukaryotes and is able to grow rapidly in liquid media. This makes it one of the simplest and practical models for the study of the eukaryotic cell. Moreover, because the respiro-fermentative metabolism during the exponential growth phase of this yeast shows some resemblance with the “Warburg effect” observed in some fast-proliferating cells such as cancer cells. This resemblance, makes *S. cerevisiae* an interesting model for the study of cancer metabolism, highlighting the vital importance of studying *S. cerevisiae*’s metabolism.

S. cerevisiae is a very versatile organism, which is able to adapt its metabolism and growth rate in response to changes in the growth medium, such as nutrient availability, and stress situations, such as oxidative *stress* or starvation. High levels of oxidants, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), create a situation of high oxidative *stress* characterized by extensive cellular damages, although low doses of this oxidant have been associated with intracellular signalling and can induce an adaptive response in cells protecting them from subsequent high oxidative *stress* conditions. Thus H_2O_2 can modulate metabolism in a concentration dependent fashion.

The overall aim of this thesis is to study the dynamics of *S. cerevisiae* metabolism in response to different growth media and to H_2O_2 . A suitable tool for the study of yeast metabolism is flow microcalorimetry as it allows following in real-time the dissipated energy resulting from all reactions of the metabolism taking place in the cell. Because all biochemical reactions and processes taking place in the cell are accompanied by heat transfer, heat measurements provide an all-inclusive surrogate of metabolic activity. Besides being extremely sensitive, microcalorimetry has several advantages over other methods used in the study of metabolism since it is a probe-free, non-invasive and non-destructive technique that allows measurements in real-time.

In this work, the question of uniform or dynamic nature of *S. cerevisiae* metabolism over the exponential phase was investigated by flow microcalorimetry supplemented by cell density evolution and oxygen and glucose consumption measurements. This involved following the yeast growth in different culture media and *stress* situations, namely oxidative *stress*. As opposed to previous studies in which prototrophic strains were used, an auxotrophic strain (BY4741), which is widely used in current laboratory studies, was selected.

It was found that the dissipated power, P , associated to the cellular metabolic activity significantly depends on the culture medium used. Growth studies carried out with 2% glucose in

two different common media, namely *Yeast Extract, Peptone and Dextrose* (YPD) and *Synthetic Complete* (SC) showed that the maximum power dissipated by BY4741 during the exponential phase was considerably higher in the rich YPD medium ($662 \pm 11 \mu\text{W}$ (n=4)) than in the less rich SC medium ($365 \pm 17 \mu\text{W}$ (n=5)). The calorimetric power-time profiles were also different in the two media. When BY474 was grown in YPD, the power increased exponentially until a maximum was reached and then abruptly changed to the approximately steady value typical of the stationary phase. When growth was carried out on SC medium two maximums were noted: the first was caused by the depletion of the amino acid methionine in the synthetic medium; the second one was similar to that observed in the other media and was also followed by a fast drop to the stationary phase value. These results outline the failure of SC medium, widely used in the selection of auxotrophic mutants in genetic approaches, to provide an unconstrained exponential growth.

Analysis of complete growth curves revealed that, regardless of the medium used, the power dissipated per cell is maximal during the transition from the lag to the exponential phase, but this maximum is higher in the poorer SC than in the richer YPD medium. This indicates that metabolic activity is maximal during transition between these two phases and higher in the poorer culture medium. Results from O_2 consumption assays suggest that the power per cell decreases continually in both media along the exponential phase possibly as a consequence of the decreasing respiratory metabolism, which is associated with a much higher enthalpy than glycolysis.

To optimize exposure conditions to H_2O_2 , the effects of different doses of this oxidant on the calorimetric curve of *S. cerevisiae*'s growth were investigated. A hormetic behaviour was noted at $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 , for which an increase in P was observed immediately after the addition of H_2O_2 , while for most concentrations H_2O_2 addition led to a decrease in P associated with cell death. For the higher concentrations a temporary arrest of the calorimetric curve was also observed.

In order to define the effects of high oxidative *stress* conditions on the proliferative capacity of growing cultures of *S. cerevisiae*, cellular viability over time following exposure to a lethal dose of H_2O_2 was assayed. It was found that the killing kinetics of H_2O_2 follows a biphasic exponential decay: a first phase is observed immediately after the addition of 1 mM (lethal dose) H_2O_2 until 3 hours; a second phase follows after the population has become adapted to high H_2O_2 concentration, becoming more resistant, as evidenced by a decrease in the number of killed cells per unit of time, with the same concentration of 1 mM. The same protocol using cells previously adapted to a sublethal dose of H_2O_2 produced similar results, indicative that even cells adapted to low doses of H_2O_2 need further adaptation in order to survive in higher *stress* situations. Adaptation reduced cellular death by decreasing the first phase duration, i.e. less time was needed for cells adapted to sublethal doses of H_2O_2 to become adapted to high lethal H_2O_2 doses.

Interestingly, cells were able to resume their exponential growth even in the presence of such high concentrations of H_2O_2 , implying an enhanced capacity to deal with the oxidative *stress*.

Curiously, the ZWF1 Δ mutant, in which the enzyme glucose-6P dehydrogenase is deleted, exhibit the same two phases of exponential decay and revealed an extreme resistance to oxidative *stress*, as evidenced by a shorter first phase and a much lower death rate during the second phase of the killing kinetics, following exposure to a lethal dose of H_2O_2 . However, this strain can only resume exponential growth when all the H_2O_2 in the medium was consumed and the adaptation protocol has no effect in the survival rate of this strain. In ZWF1 Δ mutants, NADPH production is severely affected because of G6PDH deletion. This is the first enzyme of the pentose phosphate pathway (PPP), which corresponds to the main pathway for NADPH production. Overall, the results obtained for both strains suggest a central role for PPP in the antioxidant response to lethal doses of H_2O_2 .

The effect of non-lethal doses of H_2O_2 on the metabolism of growing *S. cerevisiae* was studied via three *bolus* additions of 150 μM H_2O_2 . The power dissipated by the overall population increased slightly immediately after every addition of H_2O_2 possibly as a result of increased catabolism associated with antioxidant enzymatic activity. The three *bolus* additions produced an increase in the total heat dissipated by the growing culture of *S. cerevisiae* until the first maximum in SC media. This increase was not solely caused by H_2O_2 exposure but also due to methionine starvation, since H_2O_2 did not change the heat dissipated when the cells were grown in methionine extra-supplemented SC medium, where methionine limitation was eliminated.

A new method to determine glucose concentration was developed during this work. This method was found to be highly specific to glucose and consisted of the glucose oxidase reaction with the glucose in the sample consuming O_2 in the process. This consumption was quantified in an O_2 electrode and was proportionally related to the glucose concentration in the sample. This method has a wide range extending from 0 μM to 260 μM glucose.

Overall, the flow microcalorimetry work carried out in this Thesis confirmed and extended previous observations that metabolic changes occurring during the exponential growth phase of *S. cerevisiae* favors aerobic glycolysis over mitochondrial respiration. It was also noted that metabolism is quite dependent on the culture medium and the nutrients contained in the medium besides the carbon source. A hormetic effect at a low dose of H_2O_2 (150 μM H_2O_2) was also detected, and it was further demonstrated that high oxidative H_2O_2 *stress* kills yeast in a biphasic exponential decay fashion.

Keywords: H_2O_2 , metabolism, microcalorimetry, starvation, *S. cerevisiae*

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract	VII
Índice de Figuras.....	XII
Índice de Quadros	XIV
Lista de Abreviaturas	XV
Lista de Fórmulas químicas	XV
1. Introdução.....	1
1.1. Importância do estudo metabólico da <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	1
1.2. Fases de crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	3
1.2.1. Diferenças ao nível do crescimento em meio rico (YPD) e pobre (SC).....	4
1.3. Introdução à microcalorimetria de fluxo.....	6
1.4. Relação entre <i>S. cerevisiae</i> e H_2O_2	9
2. Objetivos.....	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Materiais	16
3.2. Material Biológico e condições de crescimento	16
3.3. Calorímetro de fluxo.....	17
3.4. Determinação do volume efetivo da célula calorimétrica	20
3.5. Curva de calibração de biomassa e número de células em função da densidade ótica	24
3.6. Determinação da concentração de glucose no meio de crescimento	25
3.7. Determinação da concentração de H_2O_2 no meio de crescimento	26
3.8. Determinação do consumo de O_2 no meio de crescimento	27
3.9. Determinação da sobrevivência da <i>S. cerevisiae</i> ao H_2O_2	27
3.10. Efeito do H_2O_2 na curva calorimétrica do crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	28
3.11. Cinética de morte da <i>S. cerevisiae</i> a uma dose letal de H_2O_2	29
3.12. Exposição de <i>S. cerevisiae</i> a adições <i>bolus</i> subletais de H_2O_2	30
3.13. Estatística	31
4. Resultados e discussão	32
4.1. Curvas calorimétricas do crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	32
4.2. Meio sintético completo falha em proporcionar um crescimento exponencial uniforme	35
4.2.1. Suplementação de metionina no meio SC é insuficiente para proporcionar um metabolismo unifásico na fase exponencial.....	38
4.2.2. A quantidade de Inositol no meio SC é insuficiente para proporcionar um crescimento exponencial constante.	44
4.3. Balanços energéticos	47

4.4.	Hormese do H ₂ O ₂	55
4.5.	Cinética de morte da <i>S. cerevisiae</i> a uma dose letal de H ₂ O ₂	59
4.5.1.	Cinética de morte da estirpe ZWF1Δ.....	63
4.5.2.	Recuperação após uma dose letal de H ₂ O ₂	65
4.6.	Efeito da adição de doses subletais de H ₂ O ₂	67
5.	Conclusões e perspectivas futuras	73
6.	Bibliografia.....	78
7.	Material suplementar.....	85

Índice de Figuras

Figura 1 - Fases do crescimento de uma cultura típica de <i>S. cerevisiae</i> a crescer em meio com glucose.	3
Figura 2 – Esquema ilustrativo da libertação de calor (ΔH) durante o metabolismo celular.	6
Figura 3 - Esquema da célula calorimétrica num calorímetro de fluxo.	8
Figura 4 – Curva dose-resposta bifásica característica do efeito de hormese.....	11
Figura 5 – Esquema do calorímetro de fluxo LKB 10700-1 usado neste trabalho.....	18
Figura 6 - Hidrólise do metilparabeno catalisada por hidróxido de sódio (base).	20
Figura 7 - Curvas calorimétricas da reação de hidrólise do metilparabeno (MP) em solução aquosa de 0.5 mol dm^{-3} hidróxido de sódio a diversas temperaturas.....	22
Figura 8 - Gráfico do $\text{Ln}(\Delta\phi)$ em função do tempo para a reação de hidrólise do MP	22
Figura 9 – Determinação da concentração de glucose do meio pelo método do Glucose oxidase.	26
Figura 10 – Dinâmica metabólica do crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em meio SC.	33
Figura 11 - Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em meio rico YPD	36
Figura 12 - Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em meio SC suplementado com aminoácidos de caseína (CAA).....	38
Figura 13 – Densidade celular (OD_{600}) da <i>S. cerevisiae</i> na fase estacionária de diversos meios SC extra suplementados.....	40
Figura 14 – A metionina e leucina são os principais aminoácidos limitantes do crescimento celular da <i>S. cerevisiae</i> em meio SC.....	41
Figura 15 - Curva calorimétrica de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 a crescer em meio SC (cinza) e em meio SC extra suplementado com 5x metionina (preto).	42
Figura 16 – Suplementação extra do meio SC com YNB ou inositol garante um crescimento exponencial constante	44
Figura 17 – Reta de calibração da biomassa de culturas de <i>S. cerevisiae</i> a crescer em meio SC (usando glucose como fonte de carbono) em função do OD_{600}	47
Figura 18 - Determinação do rendimento em biomassa de culturas de <i>S. cerevisiae</i> a crescer em meio SC.....	48
Figura 19 – Entalpia associada ao metabolismo respiro-fermentativo da glucose pela <i>S. cerevisiae</i> a crescer em meio SC.....	50

Figura 20 – Perfil de O ₂ consumido em função da glucose consumida torna-se aproximadamente linear a partir dos 20 – 40 mM glucose.	50
Figura 21 - Ganho térmico de uma cultura batch de <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 22 - Efeito de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ nas curvas calorimétricas de <i>S. cerevisiae</i> em meio SC.	55
Figura 23 - O declive do logaritmo da potência dissipada (μ_P) ao longo do tempo por uma cultura de <i>S. cerevisiae</i> diminui com o aumento da concentração de H ₂ O ₂ adicionado	56
Figura 24 – A potência dissipada por culturas de <i>S. cerevisiae</i> aumenta na exposição a uma dose subletal de H ₂ O ₂ e diminui na exposição a doses letais.	57
Figura 25 – A variação relativa da potência de <i>S. cerevisiae</i> a crescer em fase exponencial, medida imediatamente após exposição a H ₂ O ₂ produz uma curva dose-resposta bifásica (hormese).....	58
Figura 26 – Diferentes representações da curva de dose resposta.	59
Figura 27 - Curva dose-resposta do efeito do H ₂ O ₂ na viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 28 - Cinética de morte da <i>S. cerevisiae</i> BY4741 após exposição a uma dose letal de H ₂ O ₂ com (Δ) e sem (\blacksquare) adaptação prévia.	61
Figura 29 - Cinética de morte do mutante ZWF1 Δ ao longo do tempo após exposição a uma dose letal de H ₂ O ₂ com (Δ) e sem (\blacksquare) adaptação prévia.....	63
Figura 30 – Área das colónias de <i>S. cerevisiae</i> previamente adaptadas com 150 μ M H ₂ O ₂ após exposição a uma dose letal de H ₂ O ₂ ao longo do tempo.....	66
Figura 31 – As adições bolus de H ₂ O ₂ causam um aumento imediato na potência dissipada de uma população de <i>S. cerevisiae</i> em fase exponencial	67
Figura 32 - Consumo de glucose em culturas emparelhadas de <i>S. cerevisiae</i> expostas a 3 adições bolus de 150 μ M H ₂ O ₂ (Δ) e células não expostas (controlo - \blacksquare).	69
Figura 33 – Adição de H ₂ O ₂ a culturas de <i>S. cerevisiae</i> em crescimento exponencial em glucose causa uma diminuição imediata no consumo de O ₂	70

Índice de Quadros

Quadro 1 – Constantes de velocidade e volume efetivo obtidos a partir da reação de hidrólise do MP em solução aquosa de 0.5 mol dm^{-3} NaOH a diversas temperaturas.	23
Quadro 2 – Resultados calorimétricos referentes ao crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em meio SC e YPD	37
Quadro 3 - Composição em aminoácidos e bases azotadas dos meios SC e CAA.	39
Quadro 4 – Descrição dos parâmetros da curva calorimétrica das culturas de <i>S. cerevisiae</i> controlo e sujeitas a 3 doses subletais ($150 \mu\text{M}$) de H_2O_2	68
Quadro 5 - Densidade celular (OD_{600}) de culturas de <i>S. cerevisiae</i> expostas a 3 doses subletais de $150 \mu\text{M}$ de H_2O_2 e controlos.	68
Quadro 6 - Descrição dos parâmetros das curvas calorimétricas de culturas de <i>S. cerevisiae</i> controlo e sujeitas a 3 adições bolus subletais ($150 \mu\text{M}$) de H_2O_2 em meio CAA extra.	71

Lista de Abreviaturas

CAA	Meio suplementado com aminoácidos de caseína
CCP	Citocromo C Peroxidase
CFU	Unidade formadora de colónias (<i>Colony Forming Unit</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione (reduzido)
GSSG	Glutathione (oxidado)
LD ₅₀	Dose letal que mata 50% da população (<i>Lethal dose that kills 50% of the population</i>)
MP	Metilparabeno
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
P	Potência
PPP	Via dos fosfatos de pentose (<i>Pentose Phosphate Pathway</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive oxygen species</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	Meio sintético completo
SOD	Superóxido dismutase
SP	Potência específica (<i>Specific Power</i>)
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (<i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
TFK	Tampão de fosfatos de potássio
TR	Tioredoxina redutase
YPD	Meio composto por extrato de levedura (<i>yeast extract</i>), peptona (<i>peptone</i>) e D-glucose

Lista de Fórmulas químicas

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HO [•]	Radical hidroxilo
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Oxigénio molecular
[•] O ₂ ⁻	Radical superóxido

NOTA IMPORTANTE:

Por uma questão de conveniência, com o objetivo de tornar o texto mais claro, optou-se por apresentar todos os resultados numéricos usando o separador decimal internacional “.” (ponto) em vez do separador decimal “,” (vírgula) adotado em Portugal.

1. Introdução

1.1. Importância do estudo metabólico da *Saccharomyces Cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), usada tradicionalmente na fermentação de bebidas alcoólicas e na fermentação de pão, é um fungo eucariota unicelular, pertencente ao filo Ascomycetes [1]. Este microorganismo é usado como modelo celular da célula eucariota por conservar os mesmos mecanismos de replicação do material genético (DNA e cromossomas), o mesmo tipo de controlo na progressão do ciclo celular, de expressão génica e tradução, assim como as vias de transdução de sinal, de metabolismo e regulação metabólica e organização subcelular encontrados em outros eucariotas mais complexos como as células humanas [1]–[4]. Devido a esta homologia, a maioria dos processos que se pretendem estudar em humanos podem ser estudados em leveduras (o que é muito mais simples) e grande parte dos processos encontrados em leveduras podem ser transpostos para humanos (e/ou outros eucariotas), uma vez que a maioria dos genes humanos tem um equivalente nas leveduras (e vice-versa) [3]–[5].

As vantagens de trabalhar com *S. cerevisiae* em vez de células humanas (ou outro tipo de células eucariotas) a nível laboratorial são bastantes. A *S. cerevisiae* apesar de ser eucariota apresenta uma taxa de crescimento rápida em meio líquido (tempo de duplicação de ~90 minutos em metabolismo respiro-fermentativo), sendo, neste aspeto, semelhante a procariotas. É também um sistema genético facilmente manipulável através de técnicas simples (bem mais simples do que as usadas em células humanas) [4] [5]. Devido à sua importância como modelo eucariota, a *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariota a ter o seu genoma completamente sequenciado [4]–[6]. Deste projeto resultaram muitos outros com o intuito de compreender as funções celulares ou moleculares de todos os genes descobertos no genoma sequenciado [4]. Como consequência desse esforço, foram produzidas diversas bibliotecas de mutantes para cada um dos genes sequenciados (cada gene deletado [7], proteína ligada a GFP [8] [9], proteína ligada a epítipo [10]), encontrando-se essas bibliotecas disponíveis à comunidade científica.

De um ponto de vista metabólico, a *S. cerevisiae* e as células tumorais partilham características comuns, pelo que a compreensão do metabolismo da *S. cerevisiae* poderá ter um importante impacto na área da oncologia [11]. A *S. cerevisiae* é um aeróbio facultativo, que mesmo na presença de oxigénio opta pelo metabolismo fermentativo da glucose, a designada glicólise aeróbia [12]. Este fenómeno foi também observado por Warburg em 1924 em células tumorais [13], que o associou a uma repressão da respiração acompanhada de um aumento da fermentação (efeito de Warburg) [11] [14]. Nestas situações as células dependem essencialmente da fermentação para obtenção de energia, o que parece contraintuitivo devido ao aproveitamento energético bastante inferior da glicólise quando comparada com a respiração mitocondrial. Contudo o fluxo glicolítico consegue ser muito mais elevado do que o fluxo através da cadeia transportadora de eletrões acabando por ser uma forma de obtenção de energia mais rápida, que permite à célula manter uma elevada taxa de crescimento [12]. Em *S. cerevisiae* assim

como em algumas células tumorais, além da repressão e inibição da respiração causada pela glucose (efeito de Crabtree) [11] [15], há uma indução dos enzimas glicolíticos possivelmente como forma de garantir um fluxo glicolítico suficiente para compensar a baixa eficiência energética da fermentação [15].

1.2. Fases de crescimento da *S. cerevisiae*

O crescimento de uma cultura *batch* de *S. cerevisiae* em meio líquido é caracterizado por diferentes fases (Figura 1): a fase de latência (*lag*), período que antecede o crescimento exponencial; a fase exponencial, onde as células se dividem a uma taxa constante originando um crescimento exponencial; a fase pós-diáuxica, onde as células modulam o seu metabolismo para a utilização do etanol resultante da fermentação da glucose (ou outro substrato menos preferencial), crescendo a uma taxa constante inferior à da fase exponencial; e a fase estacionária, em que todos os substratos foram consumidos e o metabolismo se torna praticamente nulo com as células a entrarem num estado quiescente podendo sobreviver durante longos períodos de tempo na ausência de nutrientes [16].

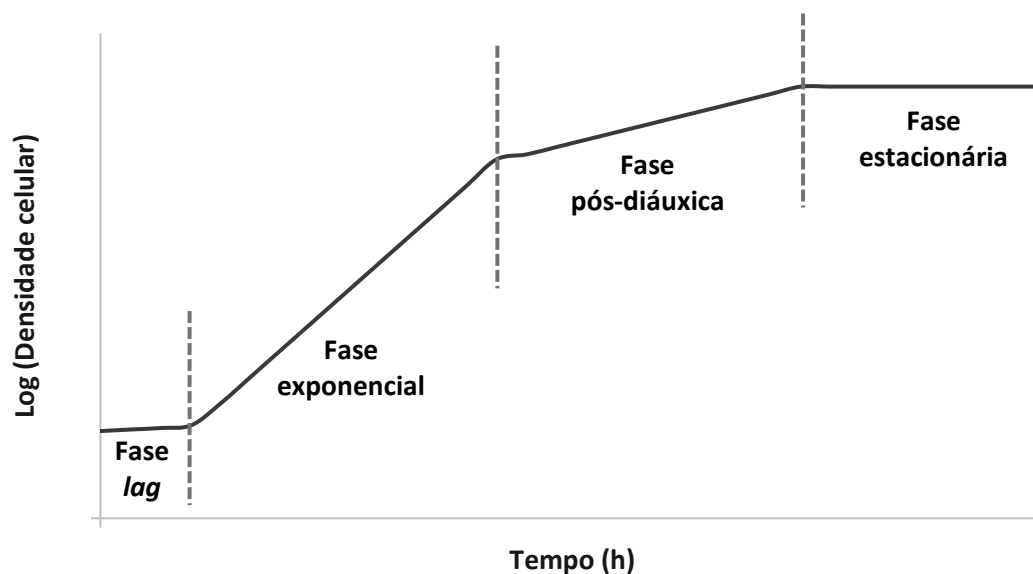


Figura 1 - Fases do crescimento de uma cultura típica de *S. cerevisiae* a crescer em meio com glucose. Após inoculação, há um período de adaptação celular ao novo meio sem crescimento e durante o qual as células não se dividem (fase lag). De seguida as células iniciam um período de proliferação rápida com crescimento exponencial constante durante o qual as células consomem a glucose por fermentação sobretudo. Quando toda a glucose é consumida, inicia-se a fase pós-diáuxica durante a qual as células utilizam o etanol formado durante a fermentação da glucose substrato. Quando todos os substratos são consumidos a *S. cerevisiae* entra na fase estacionária. A duração das fases representadas na figura não se encontra à escala.

De seguida, descreve-se em detalhe as fases de crescimento da *S. cerevisiae*. Após a inoculação de células num novo meio de cultura, estas entram num período de adaptação, fase *lag*, durante o qual apresentam uma taxa de crescimento nula ou praticamente nula [17] [18] [19]. O facto das células não se dividirem nesta fase levou a que se pensasse durante décadas que se tratava de uma fase “dormente” ou latente [17], o que originou algum desinteresse no estudo desta fase, sendo a menos estudada do crescimento celular. O início da fase *lag* é marcado por um reiniciar morfológico das células com uma pausa momentânea (cerca de 20 minutos) na síntese proteica e libertação de *buds* antigos (célula filha que permanece como uma protuberância na célula mãe) [19]. Terminado este período inicial, começa uma intensa remodelação do proteoma celular com produção de componentes celulares necessários para o crescimento exponencial, tais como: enzimas associados ao metabolismo de oses, enzimas integrados em vias biosintéticas, proteínas associadas à tradução e ribossomas [18] [20] [21] [19]. Além da intensa

atividade anabólica na fase *lag*, há também uma intensa atividade catabólica. Esta destina-se à obtenção de energia e de precursores anabólicos necessários para a remodelação do proteoma e que, por sua vez, é necessária para dar início ao crescimento exponencial [18]. A fase *lag*, ao contrário da ideia generalizada, é portanto uma fase caracterizada por uma intensa atividade metabólica [20].

A fase exponencial, também conhecida por fase log, inicia-se quando as células se começam a dividir a uma taxa máxima e constante [18]. O facto da taxa de crescimento ser constante levou a que se pensasse durante muito tempo que as células durante a fase exponencial apresentavam um metabolismo em estado estacionário [12] [15]. Durante esta fase o metabolismo é do tipo respiro-fermentativo, com uma componente respiratória cada vez menor e uma componente fermentativa cada vez mais dominante, representando a quase totalidade do catabolismo [12]. A fase exponencial é acompanhada de uma diminuição da resistência a *stresses* ao longo do tempo, nomeadamente *stress* térmico e *stress* oxidativo [12], bem como por uma alteração contínua da expressão génica e, consequentemente, do proteoma [22].

Quando toda a glucose é consumida no meio de cultura, dá-se a mudança diáuxica. A cultura passa a ter um crescimento bastante mais lento e sofre uma profunda remodelação metabólica que lhe permite utilizar uma outra fonte de energia e carbono [12] [23] [1]. Entre estas remodelações, destaca-se a diminuição da expressão de enzimas glicolíticos e um aumento dos enzimas associados ao metabolismo respiratório e ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) [23]. Em culturas *batch* o substrato usado após a mudança diáuxica é o etanol produzido durante a fermentação, sendo este metabolizado pela via da respiração mitocondrial.

Após metabolização de todo o etanol e outros substratos respiratórios disponíveis, a célula entra na fase estacionária que corresponde a um estado quiescente de baixa atividade metabólica em que praticamente não há síntese proteica, nem divisões celulares, no qual o metabolismo existente é sobretudo respiratório [16] [21].

1.2.1. Diferenças ao nível do crescimento em meio rico (YPD) e pobre (SC)

A *S. cerevisiae* é um organismo bastante versátil, tendo a capacidade de adaptar o seu metabolismo [11] e a taxa de crescimento [24] às condições envolventes, mais precisamente aos nutrientes presentes no meio de cultura. Desta forma diferentes meios de cultura podem produzir diferentes tipos de crescimento e/ou metabolismo. Regra geral, os microorganismos crescem melhor em meios ricos do que em meios sintéticos, devido à existência de precursores biosintéticos que podem ser usados nas vias anabólicas, permitindo poupar recursos da célula e consequentemente energia [25]. Foi, por exemplo, demonstrado que a *S. cerevisiae* mantida num meio rico tem uma capacidade biosintética cerca de 25 vezes superior de produzir a proteína extracelular xilanase do que em meio sintético [25] [26]. O proteoma da *S. cerevisiae* é também diferente consoante o meio de cultura usado [9]. Quando as células crescem em meios pobres há uma maior expressão de proteínas associadas a vias de síntese de aminoácidos e nucleótidos pois estes estão ausentes ou em défice no meio, sendo necessário sintetizá-

los [9]. Quando as células crescem em meios ricos há um aumento da expressão de proteínas associadas ao crescimento e divisão celulares, pois não existe grande necessidade biosintética de precursores metabólicos, uma vez que estão disponíveis no meio [9]. Sabe-se também que mais calor é dissipado numa cultura em meio pobre do que em meio rico [27].

Os meios ricos têm nutrientes suficientes para o crescimento de culturas de *S. cerevisiae* até à fase estacionária e para garantir a sua manutenção nessa fase, ao contrário do que acontece por vezes nos meios sintéticos, onde se observa uma rápida perda de viabilidade das células na fase estacionária [16]. De facto, o conteúdo dos meios sintéticos nalguns nutrientes é, frequentemente, insuficiente, dando origem a respostas de fome [28]. Este tipo de resposta pode ser originada pela depleção de nutrientes naturais (glucose, fonte de azoto, fonte de enxofre, etc), isto é, nutrientes que ao longo da evolução se esgotam frequentemente no meio envolvente e para os quais a célula desenvolveu respostas efetivas [29] [22]. Um segundo tipo de fome está associada a nutrientes auxotróficos, sendo frequentemente observado para estirpes mais recentes que possuem marcadores auxotróficos (para facilitar a seleção de mutantes), como é o caso da estirpe BY4741 (usada nesta tese) que é deletada para as vias de síntese de leucina, metionina, histidina e uracilo [7].

Em fome “natural” as células conseguem sobreviver mediante uma resposta que consiste na paragem do crescimento celular e deixando de consumir glucose, evitando o seu desperdício [29] [22]. Em situações de fome auxotrófica não existem vias de sinalização que permitam uma resposta adaptativa como a anterior, pois os nutrientes em causa foram tornados essenciais por mutação (em laboratório) e não houve evolução dessas estirpes para desenvolver respostas eficientes [29] [22]. Nestas situações as células falham em parar imediatamente o crescimento [22] [29] [30], desperdiçam a glucose do meio [29] [22] [30] e há um aumento da autofagia, possivelmente como forma de manter um reservatório (*pool*) do nutriente limitante para sínteses a partir da reciclagem de outros componentes celulares [16]. De facto a autofagia desempenha um papel importante na resposta à fome, sendo que mutantes incapazes de autofagia morrem rapidamente em situações de fome [16] [31].

Neste âmbito, um dos objetivos do trabalho foi comparar as diferenças no metabolismo da *S. cerevisiae* em meio rico e num meio mais pobre (sintético completo).

1.3. Introdução à microcalorimetria de fluxo

Durante o metabolismo existem diversas reações a ocorrer simultaneamente às quais está associada libertação de calor (Figura 2). O calor dissipado corresponde à soma algébrica das entalpias de todas essas reações (anabólicas e catabólicas) [27]. Portanto todos os organismos vivos durante o seu metabolismo apresentam dissipação de calor [32]. Para além disso, mudanças metabólicas podem ser sinalizadas por alterações no padrão de calor dissipado ao longo do tempo. Isso torna a calorimetria num método particularmente importante para o estudo do metabolismo [27] [32] [33] [34]. Esta técnica é não invasiva e não destrutiva, além de permite seguir o metabolismo em tempo real [35] [32]. Porém as medidas calorimétricas são inespecíficas, isto é, refletem o calor libertado globalmente pelo conjunto dos processos metabólicos. Para extrair informação específica das experiências calorimétricas, estas devem ser acompanhadas por medidas auxiliares de vários parâmetros, como por exemplo, teor em glucose, pH, densidade celular ou outros metabolitos [32] [36] [35].

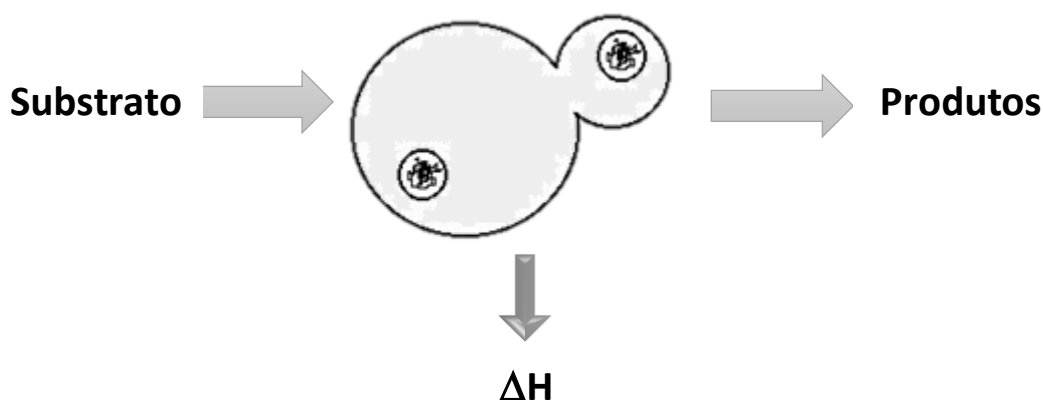


Figura 2 – Esquema ilustrativo da libertação de calor (ΔH) durante o metabolismo celular.

Desde cedo a calorimetria foi usada para investigar o metabolismo, tendo o primeiro estudo “calorimétrico” deste tipo sido efetuado nos finais do século XVIII por Lavoisier e Laplace [37]. Neste caso o objetivo foi investigar a dissipação de calor associada ao metabolismo de um porquinho-da-índia, usando um “calorímetro de gelo” [37]. O porquinho-da-índia foi colocado dentro de uma célula calorimétrica rodeada por uma camisa contendo gelo e a dissipação de calor associada ao metabolismo do animal foi determinada através da quantidade de gelo fundido durante um intervalo de tempo conhecido, tendo sido obtido um valor de cerca de 3 W kg^{-1} [32] [35] [34]. Lavoisier e Laplace concluíram, ainda, que a massa de gelo fundido era proporcional ao calor produzido. Em meados do século XIX, foi realizado pela primeira vez um estudo calorimétrico (ainda primitivo) em sistemas microbiológicos, por Pierre Dubrunfaut (considerado o pai da macrocalorimetria moderna) [38, p. 945]. Dubrunfaut determinou a entalpia associada à fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, através do aumento de temperatura de um bioreactor durante a fermentação. O valor obtido foi devidamente corrigindo para ter em conta perdas de energia por radiação, convecção, evaporação e aumento de

temperatura das paredes do reator. O resultado final encontrado ($-94.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [38, p. 945]) é bastante próximo do valor calculado ($-97.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [36]) com base nos valores de entalpias de formação dos produtos e reagentes.

Claro que desde as experiências de Lavoisier e Dubrunfaut houve avanços na aplicação da calorimetria. Os avanços foram, contudo, lentos, muito graças à falta de sensibilidade dos calorímetros disponíveis [32] [35]. Apenas com o surgimento de microcalorímetros capazes de detetar variações de potência na escala micro (μW), permitindo detetar os processos biológicos sem ter de usar volumes de amostra enormes (forma como Dubrunfaut tinha contornado o problema da baixa potência), é que a calorimetria voltou a ser aplicada à biologia [35].

A “biocalorimetria” tem sido usada para identificar microorganismos, possibilitando, por exemplo: discriminar rapidamente diferentes patógenos clinicamente relevantes que possuem perfis calorimétricos característicos, detetar contaminações bacterianas em sangue doado ou ainda identificar microorganismos no solo e na água [35] [39]. Outras aplicações mais dirigidas à área farmacêutica passam pelo estudo do efeito de fármacos (e outras substâncias tóxicas ou benéficas) no metabolismo celular. Através dessas experiências é possível determinar, por exemplo, parâmetros como a concentração inibitória mínima (MIC) ou a dose letal que mata 50% da população (LD_{50}); verificar se determinado antibiótico é um bactericida ou um bacteriostático [35] [39]; ou, ainda, como foi o caso deste trabalho, avaliar efeitos horméticos que não são detetados por outras técnicas microbiológicas menos sensíveis. A aplicação da calorimetria em estudos fundamentais da energética associada ao crescimento ou metabolismo celulares, tem permitido, por exemplo, a discriminação do tipo de metabolismo consoante a entalpia associada; a análise quantitativa da eficiência metabólica de diferentes tipos de metabolismo ou do metabolismo ao longo do tempo [32]; ou ainda acompanhar a evolução em tempo real de diversos processos biotecnológicos, como a fermentação alcoólica. Para além das aplicações da calorimetria a nível microbiológico, a calorimetria também é usada em estudos biomoleculares relacionados com membranas celulares, ligação de moléculas a centros ativos e ainda reações enzimáticas [35].

Existem diversos tipos de calorímetros utilizados na biocalorimetria. Contudo a classe mais amplamente utilizada é a dos microcalorímetros isotérmicos de fluxo de calor, em que o calor produzido na célula calorimétrica pelo processo em estudo é transferido através de uma termopilha (conjunto de termopares) para um termostato com uma capacidade calorífica “infinita” quando comparada com a da célula calorimétrica [27] [32] (Figura 3).

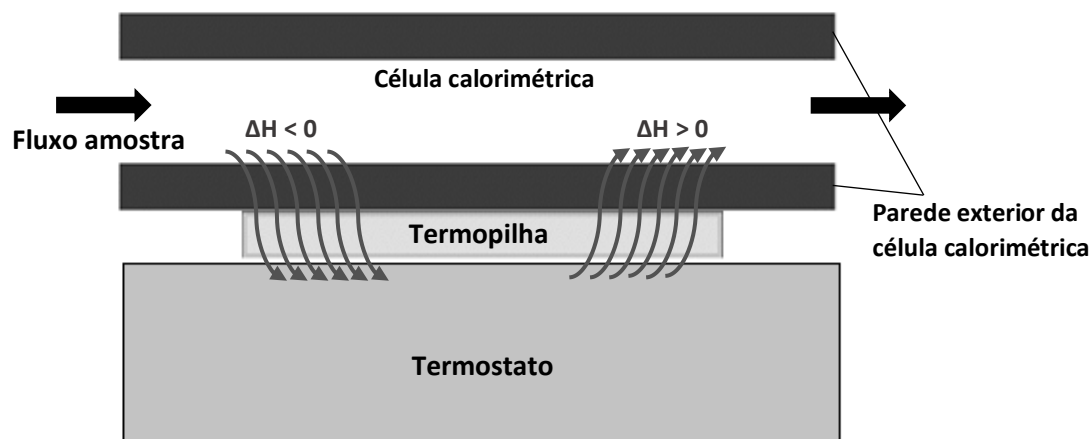


Figura 3 - Esquema da célula calorimétrica num calorímetro de fluxo. Em processos exotérmicos ($\Delta H < 0$) a transferência de calor dá-se através da termopilha no sentido célula calorimétrica para o dissipador de calor, gerando um diferença de potencial que é proporcional à quantidade de calor trocada. Nos processos endotérmicos ($\Delta H > 0$) a transferência de calor através da termopilha dá-se no sentido inverso gerando um ΔV de sinal oposto.

O metabolismo celular gera uma diferença de temperatura entre o exterior da célula calorimétrica e o termostato. Essa diferença de temperaturas tem tendência a desaparecer mediante transferência de calor entre a célula e o termostato através da rede de termopares que constituem a termopilha. A existência de uma diferença de temperatura origina uma diferença de potencial (ΔV) entre o terminal da termopilha que está do lado da célula calorimétrica e o que está do lado do termostato. Essa diferença é proporcional à diferença de temperatura e pode ser medida com um nanovoltímetro [40].

Os primeiros microcalorímetros apresentavam problemas associados à sedimentação de células e à oxigenação das mesmas. Por isso, os estudos calorimétricos estiveram algo limitados ao estudo do metabolismo anaeróbio até ao surgimento dos microcalorímetros de fluxo (calorímetro usado neste trabalho) [27] [32] [35]. Neste subtipo de calorímetros isotérmicos as células são incubadas num bioreactor, possibilitando condições de oxigenação e agitação semelhantes às culturas *batch* de laboratório, enquanto parte da amostra é continuamente circulada com um fluxo constante entre a célula calorimétrica e o bioreactor.

Apesar da microcalorimetria de fluxo ter diversas vantagens, tem também as suas desvantagens: o tempo de transferência das células entre o bioreactor e a célula calorimétrica é cerca de 2 minutos (mais 2 minutos da célula ao bioreactor), impossibilitando o estudo de respostas imediatas (< 2 minutos) e o tipo de metabolismo durante esse tempo de transferência pode-se alterar como consequência da depleção de algum componente do meio ou substância a estudar ou ainda do oxigénio; a adesão de células à parede da célula calorimétrica, que pode levar a picos na curva calorimétrica resultantes do processo de adesão ou uma diminuição do sinal pois essas células têm uma potência inferior; variações no fluxo nominal da amostra através da célula calorimétrica afetam a potência medida [35].

1.4. Relação entre *S. cerevisiae* e H_2O_2

O aparecimento de oxigénio na atmosfera terrestre permitiu o desenvolvimento de um metabolismo respiratório mais eficiente, mas que leva à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) na célula [41] [42]. Durante muitos anos os ROS foram vistos como um produto secundário inevitável do metabolismo respiratório.

A maioria dos ROS produzidos intracelularmente, são de origem mitocondrial [41] [43] [44]. A formação do radical superóxido ($\cdot O_2^-$) na cadeia transportadora de eletrões ocorre sobretudo através da doação (não enzimática) de um eletrão do radical semiquinona ($\cdot QH$) para o oxigénio molecular (O_2) [41][43][44][45]. Este processo ocorre durante a transferência de eletrões do complexo I para a ubiquinona (Q) e do ubiquinol (QH_2) para o complexo III, em ambos os casos através do radical $\cdot QH$ [46]. Em situações normais, estima-se que cerca de 0.1 a 4% do oxigénio consumido pelos mitocôndrios tenha como destino a formação de $\cdot O_2^-$ [47][48].

O $\cdot O_2^-$ formado na cadeia respiratória é imediatamente convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pelo superóxido dismutase (SOD) [46] [41], pelo que a concentração de $\cdot O_2^-$ na célula é desprezável [49] [50]. De facto o H_2O_2 é a molécula ROS mais relevante e abundante a nível biológico, sendo bem mais estável (tempo de semi-vida mais longo) e menos reativo que os anteriores radicais. O H_2O_2 formado, apesar de ser pouco reativo, comparativamente a outros ROS, pode originar radicais extremamente reativos como o radical hidroxilo ($HO\cdot$). O radical $HO\cdot$ é formado através da reação de Fenton [41] [51]. A formação de $HO\cdot$ é potenciada na presença de metais no meio intracelular. Dada a sua extrema reatividade, o $HO\cdot$ reage indiscriminadamente com a maioria dos componentes celulares apresentando baixo potencial sinalizador na célula e elevada toxicidade, sendo o principal responsável pelos efeitos citotóxicos do H_2O_2 [51] [52] [53].

A homeostase *redox* da célula é mantida através do balanço entre a concentração de oxidantes e antioxidantes na célula. Quando os ROS aumentam intracelularmente pode-se criar um desequilíbrio, favorável aos oxidantes, gerando-se uma situação de *stress* oxidativo [41] [54] [55]. Em situações de *stress* oxidativo, os ROS produzidos podem afetar diversas funções celulares através da oxidação de ácidos nucleicos (podendo, inclusivamente, originar quebras no DNA), proteínas e biomembranas [41] [46] [55]. O *stress* oxidativo encontra-se associado a diversas doenças humanas como o cancro causado por mutações no DNA, doenças associadas ao envelhecimento, artrite reumatóide ou doenças cardiovasculares [41] [46] [56].

Na visão clássica dos oxidantes, os ROS são algo completamente nocivo, que deve ser imediatamente eliminado. As células de facto desenvolveram mecanismos que permitem, até certo ponto, reverter os danos causados pelo *stress* oxidativo, mas também mecanismos de proteção antioxidante [41] [46]. Estes últimos passam pela síntese de antioxidantes intracelulares como glutathione (GSH) e pela expressão de enzimas antioxidantes como os SOD, as catalases citosólico e peroxissomal,

os glutathione peroxidases (GPx), os peroxiredoxinas e tioredoxinas, que vão consumir os ROS [41] [56] [57] [58] [55]. Contudo há cada vez mais evidências a nível experimental que em concentrações subletais o H_2O_2 é uma molécula sinalizadora do estado *redox* da célula e que atua em diversas vias de sinalização *redox*, controlando vários processos e funções celulares básicos [41] [42] [51] [59].

A sinalização *redox* exercida pelo H_2O_2 é dependente da modificação da atividade de proteínas chave na sinalização intracelular, mediante oxidação de resíduos de cisteína presentes nessas proteínas [41] [42] [51]. A oxidação dos resíduos de cisteína das proteínas é dependente do seu microambiente e da concentração de H_2O_2 [41] [42] [51]. Isto faz que alguns resíduos de cisteína sejam mais reativos do que outros, sendo mais facilmente oxidados a baixas concentrações de H_2O_2 [41] [42] [51]. Este tipo de estratégia permite obter vários níveis de regulação que são dependentes da concentração de H_2O_2 .

Entre as proteínas reguladas pelo nível de *stress* oxidativo encontram-se diversos fosfatases e cinases de tirosina que são, respetivamente, inibidos e ativados pelo H_2O_2 [42] [46]. A alteração do nível de fosforilação de diversas proteínas intracelulares para um estado de maior fosforilação leva, por exemplo, à ativação das vias dos MAPK cinases, que estão envolvidas na resposta anti-inflamatória [42]. O H_2O_2 pode exercer ainda efeitos a nível do controlo da transcrição, ativando ou inibindo diversos fatores de transcrição por oxidação dos resíduos de cisteína (ou indiretamente via fosforilação). Um exemplo deste tipo de regulação é a ativação dos fatores de transcrição Nrf2 (em humanos) ou YAP1 (em levedura), pelo H_2O_2 [46] [60]. Ambos estes fatores de transcrição vão promover o aumento da transcrição dos enzimas antioxidantes, num *loop* de retroação negativa [46] [60]. A resposta das células quando expostas a um *stress* oxidativo é mais do que uma simples resposta antioxidante, pois diferentes vias de sinalização, envolvidas em diversos processos celulares, são afetadas pelas modificações pós-traducionais e transcricionais induzidas pelo H_2O_2 .

Como resposta ao H_2O_2 há uma alteração do proteoma, consequência de uma indução ou repressão da expressão génica de diversos genes [55] [61]. Entre os genes induzidos encontram-se genes associados à resposta antioxidante [55]: catalase citosólico (CTT1), citocromo c peroxidase (CCP), SOD1 e SOD2, tioredoxina 1 e 2, tioredoxina redutase e glutathione redutase; genes de *chaperones* moleculares, que vão ajudar no *folding* ou na eliminação de proteínas anormais que se acumulam como consequência do *stress*; e alguns proteases e componentes associados ao proteassoma, que vão degradar as proteínas anormais ou *misfolded*. O H_2O_2 é ainda responsável por uma inibição da transcrição de elementos associados à maquinaria de tradução, causando uma diminuição da síntese proteica e, consequentemente, afetando o crescimento celular [55]. Em conjunto estes resultados indiciam uma alteração da atividade celular de um programa biosintético para um programa mais associado a manutenção e proteção [55]. A nível metabólico, o H_2O_2 é responsável por uma repressão do ciclo do TCA e um desvio do metabolismo glicolítico (reprimindo a glicólise) para a PPP (indução de 3 enzimas dessa via) [55], com o objetivo de formação de NADPH necessário para a regeneração do GSH e da tioredoxina na resposta antioxidante.

Em *S. cerevisiae*, a exposição a concentrações subletais de H_2O_2 origina uma resposta adaptativa da célula, que é transiente e ótima 45 minutos após exposição ao H_2O_2 , aumentando a sobrevivência celular numa exposição subsequente a uma dose maior (letal) [56] [57] [58] [62]. Esta adaptação é dependente da síntese *de novo* de enzimas associados à resposta antioxidante como o catalase, o SOD, o citocromo c peroxidase, tioredoxina e TR e GR [56] [57] [58] [62]. Esta retroação negativa é responsável pelo aumento do consumo de H_2O_2 intracelular, o que associado à diminuição da permeabilidade da membrana ao H_2O_2 [63] causada por uma remodelação na composição da membrana celular, aumenta o gradiente de H_2O_2 entre o interior e exterior da célula, sendo a concentração de H_2O_2 no interior da célula muito inferior à exterior o que reduz o *stress* e os danos a ele associados.

A adaptação celular a doses subletais de H_2O_2 pode ser vista como o resultado da resposta celular através de um mecanismo de sobrecompensação [64]. Este mecanismo gera uma resposta que é excessiva para o *stress* aplicado. Contudo essa resposta excessiva acaba por beneficiar o indivíduo num *stress* subsequente [65]. Essa vantagem adquirida é um efeito de hormese por sobrecompensação [65]. De acordo com [65] a hormese é um termo geral associado a uma resposta adaptativa caracterizada por relações dose-resposta bifásicas (em forma de U ou \cap) que exibem um efeito estimulatório a doses baixas e um efeito inibitório a doses elevadas (Figura 4). Além da hormese associada à adaptação também já se observou que o H_2O_2 em doses adaptativas tem um efeito estimulatório sobre a proliferação celular [66] [67] e sobre a longevidade celular em *S. cerevisiae* [68] [69] .

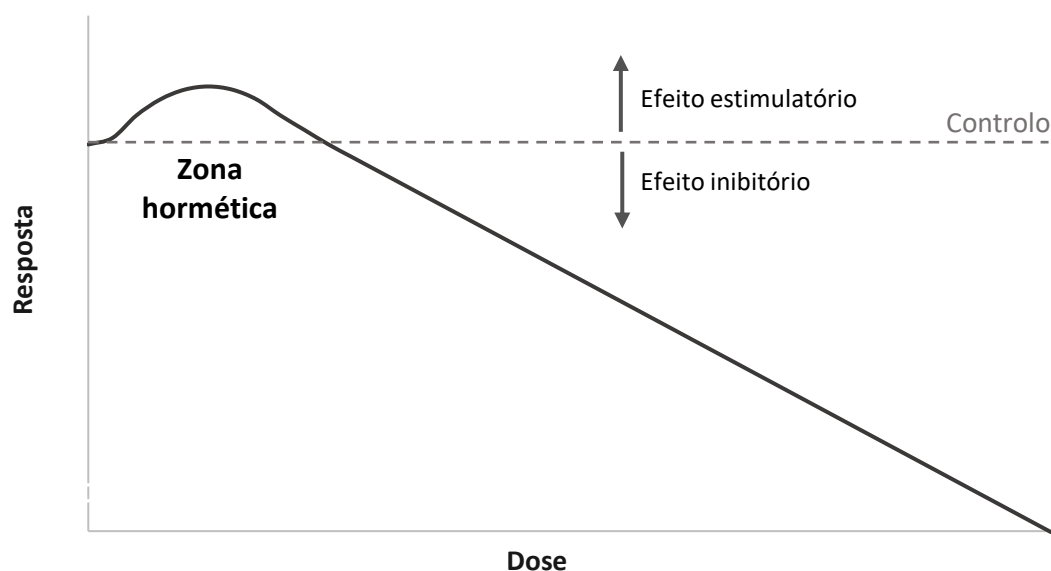


Figura 4 – Curva dose-resposta bifásica característica do efeito de hormese. Neste tipo de curvas bifásicas observa-se um efeito estimulatório sob a variável de resposta a baixas concentrações. Doses mais elevadas produzem um efeito negativo ou inibitório sob a variável de resposta. A gama de concentrações para a qual se observa um efeito estimulatório constitui a zona hormética.

O glutathione (GSH) é um tripéptido linear (γ -glutamil-cisteinil-glicina) e uma importante defesa antioxidante, presente em praticamente todos os organismos (defesa ubíqua) [58] [57] . Para além de

importante na resposta antioxidante é necessário na adaptação celular ao H_2O_2 [58]. O GSH pode reduzir radicais e ROS diretamente (reação não-enzimática) ou através da reação enzimática do glutathione peroxidase (GPx), resultando na oxidação de 2 moléculas de GSH a GSSG (forma-se uma ligação persulfureto) [57] [70] [71]. A reciclagem do GSSG a GSH é feita à custa do consumo de 2 moléculas de NADPH numa reação catalisada pelo enzima glutathione redutase (GR) [57] [71].

Dada a importância do GSH, não é portanto de surpreender que haja um aumento de expressão do GR, simultaneamente com enzimas associados à produção de NADPH na resposta ao *stress* oxidativo, como o 6-fosfato de glucose desidrogenase (G6PDH) [55]. O G6PDH é o primeiro enzima da via dos fosfatos de pentose (PPP), a principal via de produção de NADPH. Neste contexto, o G6PDH apresenta um papel determinante na resposta antioxidante pois é o enzima que catalisa o primeiro passo irreversível da via PPP, determinando a entrada de substrato na via e consequentemente a produção de NADPH na célula [57]. Deficiências na atividade do G6PDH encontram-se na base de doenças humanas como a anemia hemolítica. Nesta doença, há uma dificuldade acrescida na produção de NADPH, traduzindo-se numa reciclagem deficiente de GSH e, consequentemente, baixos níveis de GSH. Esta situação acaba por gerar um elevado *stress* oxidativo intracelular, vantajoso em casos de infeção pelo parasita da malária, *Plasmodium falciparum*, pois este é extremamente sensível ao *stress* oxidativo gerado [57] [71]. A deleção do gene codificante do G6PDH, o ZWF1, também em *S. cerevisiae* foi demonstrado ser essencial para a adaptação celular ao H_2O_2 , sendo que a sua deleção aumenta ainda a suscetibilidade dos mutantes a doses letais de H_2O_2 [57].

Tal como anteriormente mencionado, a sinalização do H_2O_2 é dependente da sua concentração. Consequentemente, o modo como o H_2O_2 é adicionado à amostra, pode introduzir alguma variação ao nível dessa sinalização [72]. Existem sobretudo duas formas distintas de adicionar o H_2O_2 a uma cultura de células: adição *bolus* e estado estacionário.

Dependendo do modo de adição do H_2O_2 , as células apresentam diferentes modulações do fator de transcrição NF-kB em células humanas (H_2O_2 em sinergismo com $TNF\alpha$). Em caso de estado estacionário o H_2O_2 ativa o NF-kB, enquanto que por adição *bolus* o comportamento é o inverso [73]. Outro exemplo é o efeito do H_2O_2 na atividade do sintase de ácidos gordos, em *S. cerevisiae*, que é estimulatório a 100 – 150 μM H_2O_2 através de um estado estacionário, mas a mesma concentração por adição *bolus* não tem qualquer efeito [74]. Ainda noutro trabalho observou-se que quando 150 μM de H_2O_2 são adicionados a células T *Jurkat* por uma adição *bolus* gera-se uma resposta apoptótica, contudo a mesma concentração em estado estacionário, surpreendentemente, tem um efeito inibitório sob a apoptose [75]. Este efeito inibitório foi associado à inibição de proteínas sinalizadoras da apoptose celular resultante de um estímulo prolongado de H_2O_2 [75]. Estes exemplos são ilustrativos do modo como a administração do H_2O_2 pode ter um importante impacto nos resultados obtidos.

A adição *bolus* é o método mais simples. Consiste na adição a uma cultura celular da quantidade de H_2O_2 necessária para gerar a concentração que se pretende estudar. Este não é o melhor método pois devido ao rápido consumo do H_2O_2 pelas células, a concentração começa a diminuir logo após a adição [72]. Uma vez que a sinalização do H_2O_2 é dependente da concentração é difícil garantir que os efeitos observados são referentes à concentração inicial (ex.: $150\mu\text{M}$) e não a uma concentração intermédia atingida após algum consumo (ex.: $100\mu\text{M}$). Por vezes, para compensar o H_2O_2 que é imediatamente consumido, adiciona-se uma concentração superior à pretendida [72]. Contudo esta também não é a melhor solução pois concentrações superiores de H_2O_2 podem conduzir à ativação ou repressão de outros genes ou proteínas, resultando numa resposta/efeito diferente. A falta de reprodutibilidade associada a este método deriva sobretudo do facto do perfil de concentração do H_2O_2 ao longo do tempo ser dependente da densidade celular a que é feita a adição pois ter mais células ou menos células na cultura vai afetar a velocidade de consumo do H_2O_2 e consequentemente o perfil de concentração ao longo do tempo. Logo a resposta pode variar entre diferentes experiências [72]. Este método foi o primeiro e mais simples, sendo útil em casos cujo objetivo é estudar os danos causado pelo *stress* oxidativo sem necessidade de uma concentração exata. Torna-se, porém, insatisfatório em estudos de efeitos regulatórios envolvendo baixas concentrações de H_2O_2 , sendo neste caso vantajoso optar pela metodologia do estado estacionário que permite um controlo mais estreito da concentração usada no ensaio [72].

No método do estado estacionário, é feita uma adição *bolus* inicial à concentração que se pretende estudar e essa concentração é depois mantida através de um sistema de reposição do H_2O_2 que mantém uma velocidade de produção igual à velocidade de consumo do H_2O_2 pelas células [72]. De entre os métodos de reposição de H_2O_2 destaca-se a reação do enzima glucose oxidase que consome D-glucose e O_2 do meio e produz H_2O_2 e gluconolactona ou métodos mais físicos à base de adições *bolus* de baixas concentrações em curtos intervalos de tempo (de minuto a minuto por exemplo) de forma a repor o H_2O_2 consumido nesse(s) intervalo(s) [72]. A adição em estado estacionário não é tão influenciada pela densidade celular pois a reposição de H_2O_2 no meio é continuamente ajustada de forma a manter uma concentração de H_2O_2 constante ao longo do ensaio.[72]. Este método é bem mais trabalhoso que o anterior mas elimina a dependência entre os resultados obtidos e o perfil de concentração ao longo do tempo, sendo portanto muito mais reprodutível [72].

Uma outra forma de obter uma aproximação eficiente ao estado estacionário (e que foi usado neste trabalho) é a adição de H_2O_2 a culturas bastante diluídas, em que o consumo de H_2O_2 pelas células é praticamente nulo durante toda a duração do ensaio. Este método é bem mais simples que o anterior, mas tem o inconveniente de requerer métodos de medição da resposta sensíveis devido ao baixo número de células (3.7×10^5 a 7.4×10^5 células $\cdot \text{mL}^{-1}$ neste trabalho). Este inconveniente inviabiliza, por exemplo, usar este tipo de ensaio no calorímetro usado neste trabalho, pois a baixa densidade celular resultaria num sinal calorimétrico praticamente inexistente.

A resistência ao *stress* oxidativo não é constante (diminui) ao longo da fase exponencial [12], pelo que ambos os métodos descritos são afetados pela fase do crescimento em que é feita a adição. Isto é, se a exposição ao H_2O_2 é feita durante o início da fase exponencial ou, alternativamente, durante a fase exponencial tardia, os resultados vão ser diferentes como consequência das diferentes resistências ao *stress* oxidativo em ambas as fases. Deste modo, a etapa da fase de crescimento em que a exposição celular ao H_2O_2 ocorre é um importante parâmetro para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Um dos objetivos deste trabalho foi investigar o efeito tóxico causado pelo H_2O_2 em elevadas concentrações ao nível do metabolismo e viabilidade celular, bem como o estudo de doses adaptativas de H_2O_2 , sobretudo, usando adições *bolus*. Optou-se pelo método da adição de *bolus*, essencialmente, por se tratar do método para o qual mais resultados já foram publicados, possibilitando, assim, uma comparação mais direta dos resultados aqui obtidos com a literatura.

2. Objetivos

O objetivo geral desta Tese foi estudar a dinâmica do metabolismo da *S. cerevisiae* na resposta a diferentes meios de cultura e ao H₂O₂. A microcalorimetria de fluxo foi a ferramenta central desse estudo, permitindo acompanhar o metabolismo em tempo real.

Resumidamente, os objetivos deste trabalho foram:

- (1) Compreender o efeito do meio de cultura nas curvas calorimétricas de *S. cerevisiae* e identificar possíveis limitações nutricionais no meio SC;
- (2) Comparar o efeito de diferentes doses de H₂O₂ sob a viabilidade e perfil calorimétrico da *S. cerevisiae*;
- (3) Avaliar a resposta celular da *S. cerevisiae* a doses subletais de H₂O₂ através de três adições *bolus* consecutivas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

O extrato de levedura, bacto-peptona, o YNB (*Yeast Nitrogen Bases*), o bacto-agar e o hidrolisado ácido de aminoácidos de caseína (casaminoácidos) foram obtidos da Becton, Dickinson and Company (BD) (Le Pont de Claix, França). A glucose e o peróxido de hidrogénio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os enzimas catalase (EC 1.11.1.6) de fígado bovino e Glucose oxidase (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger*, assim como as bases adenina e uracilo e os aminoácidos His, Leu, Trp, Ser, Thr, Arg, Met, Tyr, Ile, Lys, Phe, Val, Asp e Glu foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

3.2. Material Biológico e condições de crescimento

Este trabalho foi maioritariamente realizado com a estirpe haploide de *S. cerevisiae* BY4741 (Y00000; *wild-type*, genótipo MATa, *his3ΔI*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) [7], mas também com a estirpe isogénica da BY4741 deletada para o gene do 6-fosfato de glucose desidrogenase, a ZWF1Δ (Y01971; genótipo da BY4741 com *YNL241c::kanMX4*), ambas obtidas da EUROSCARF (Frankfurt, Alemanha).

Os *stocks* de células foram mantidos em glicerol a -80°C e todos os meses foram feitos novos riscados em placa de YPD e usados como *stock* de trabalho. O crescimento celular foi feito em meio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*), contendo 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona e 2% (m/v) D-glucose, ou em meio Sintético Completo (SC) contendo 6.85% (m/v) YNB, 2% (m/v) D-glucose, 0.0025% (m/v) adenina, 0.0025% (m/v) uracilo, 0.01% (m/v) histidina, 0.01% (m/v) leucina, 0.005% (m/v) triptofano, 0.04% (m/v) serina, 0.02% (m/v) treonina, 0.002% (m/v) arginina, 0.02% (m/v) metionina, 0.03 % (m/v) tirosina, 0.03% (m/v) isoleucina, 0.03 % (m/v) lisina, 0.05 % (m/v) fenilalanina, 0.1 % (m/v) aspartato e 0.1% (m/v) glutamato tal como em [63]; ou em meio SC suplementado com caseína (CAA) contendo 6.85% (m/v) YNB, 2% (m/v) D-glucose, 0.0025% (m/v) adenina, 0.0025% (m/v) uracilo, 0.005% (m/v) triptofano e 0.6% (m/v) casaminoácidos. As culturas foram incubadas à temperatura de 30 °C com agitação orbital numa incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen a 160 rpm (ou na incubadora do calorímetro, termostatzada a 30°C e com agitação por intermédio de um agitador magnético), em condições aeróbias *batch*. Todas as experiências foram realizadas em meio de cultura preparado no dia anterior ou no próprio dia de forma a ter maior reprodutibilidade. Todos os componentes usados nos meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos, à exceção dos aminoácidos e bases que foram esterilizados a 110 °C durante 20 minutos. Todo o material de vidro usado para cultura de células (inclusive o reator do calorímetro com o agitador magnético) e preparação de meio estéril foi esterilizado por calor seco numa estufa a 170 °C durante 3 horas no mínimo.

As culturas foram iniciadas à densidade celular de 0.035 OD₆₀₀ (densidade ótica a 600 nm) a partir de uma pré-cultura de *S. cerevisiae* crescidas *overnight* em meio SC ou YPD, dependendo da cultura

que se pretendia fazer, sendo que culturas em YPD foram iniciadas de uma pré-cultura em YPD e vice-versa.

No caso de experiências calorimétricas, após a inoculação da cultura esta foi dividida em duas frações: uma em que 20mL de cultura foram transferidos para um reator de vidro estéril (contendo um agitador magnético) e imediatamente transferida para a incubadora do calorímetro e postas a circular no calorímetro, onde se seguiu a sua evolução calorimétrica; e a outra que foi transferida (ou mantida) para um *erlenmeyer* estéril, mantendo uma relação de 1:5 entre volume de cultura e volume de ar no *erlenmeyer* de forma a garantir condições de *batch* aeróbias. Esta última cultura foi crescida numa incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen com agitação orbital e usada para acompanhar os OD₆₀₀, consumo de O₂ e/ou consumo de glucose da cultura em paralelo no calorímetro. As culturas apesar de crescidas em condições ligeiramente diferentes não manifestam diferenças no seu crescimento celular, pelo que esta aproximação é válida.

3.3. Calorímetro de fluxo

Todas as experiências calorimétricas foram realizadas num calorímetro de fluxo LKB 10700-1 adaptado para o estudo de culturas celulares (Figura 5) [76]. O aparelho inclui 3 partes essenciais: (i) um recipiente de vidro com água termostatzada à temperatura de trabalho (1) no qual encaixa o reator de vidro (2) contendo a cultura celular; (ii) uma incubadora composta por um termostato de ar (3) onde foi mantido todo o equipamento associado à cultura de células como o recipiente de vidro, o reator de vidro, os tubos de teflon, a bomba peristáltica e a placa de agitação; e (iii) o calorímetro de fluxo (4) que monitoriza a libertação de calor pelas células numa curva potência-tempo. Para assegurar uma boa oxigenação da amostra, esta é mantida sob agitação magnética e o reator (2) é tapado com um tampão de gaze (estéril) para evitar contaminações. Todo o sistema encontra-se termostatzado à temperatura de trabalho (normalmente 30 °C), inclusive os tubos de teflon (5) (0.8 mm diâmetro interno, 1.5 mm diâmetro externo) usados para circular a cultura entre o reator e a célula calorimétrica *flow through* (6) e de volta para o reator. Isto foi conseguido mantendo os tubos de teflon que saem da incubadora e que voltam do calorímetro para a incubadora dentro de tubos PVC flexíveis e vedados (7) (25 mm diâmetro interior e vedados por uma camada de 5 mm de poliuretano) onde ar termostatzado da incubadora/termostato de ar (3) é ventilado por um sistema de ventoinhas (8), sendo o mesmo sistema de ventoinhas usado para assegurar uma distribuição uniforme da temperatura em toda a incubadora.

Diferentes unidades termostáticas asseguraram uma estabilidade de temperatura de ± 0.01 °C no reator de vidro (banho externo termostatzado – HAAKE DC 5 unit) (9), ± 0.02 °C na incubadora/termostato de ar (Julabo LC6 controller) (10) e ± 0.008 °C no calorímetro (termostato de ar do calorímetro LKB 10700-1) (11). O controlador Julabo F25-EC (12) serviu como fonte fria (*heat sink*) dos termostatos de ar do calorímetro (11) e da incubadora (3).

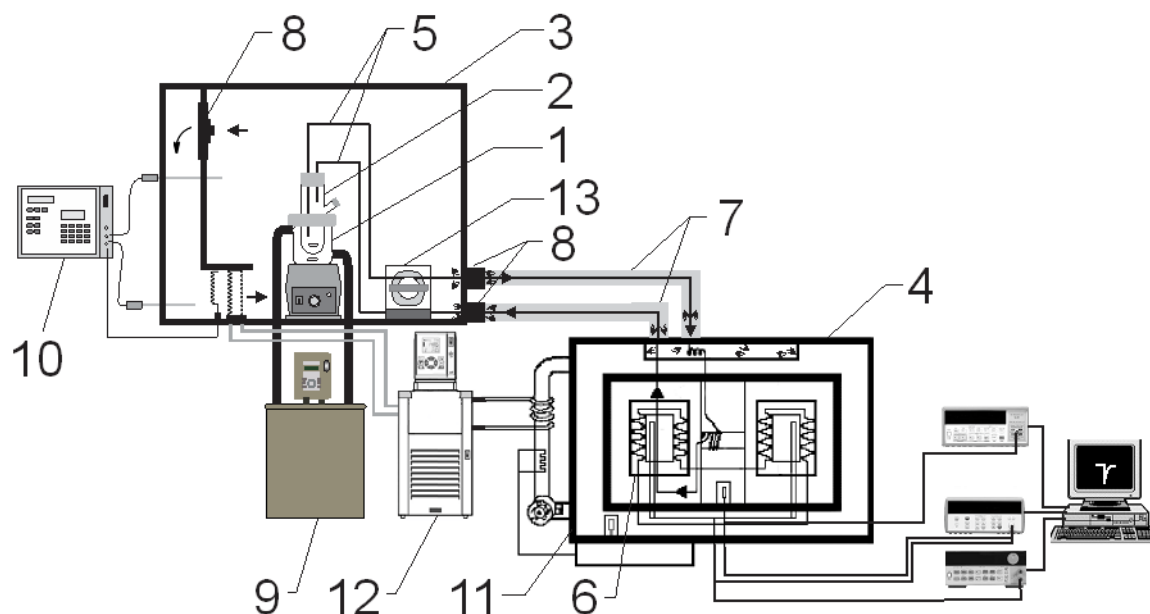


Figura 5 – Esquema do calorímetro de fluxo usado neste trabalho: (1) recipiente de vidro com água termostatzada; (2) reator de vidro contendo a cultura celular; (3) incubadora/termostato de ar; (4) calorímetro LKB 10700-1; tubos de teflon (0.8 mm diâmetro interior, 1.5 mm diâmetro exterior) usados para a circulação da amostra; (6) célula calorimétrica flow-through; (7) tubos de PVC revestidos com poliuretano dentro do qual os tubos de teflon passam no percurso entre a incubadora e o calorímetro, funcionando como isolamento térmico, sendo estes tubos termostatzados com ar da incubadora por intermédio de ventoinhas (8); (9) controlador de banho HAAKE DC5 unit; (10) Controlador de temperatura da incubadora Julabo LC6; (11) termostato de ar do LKB 10700-1; (12) Fonte fria Julabo F25-EC; (13) Bomba peristáltica multicanal de 12 rolos Ismatec MS-4/12.

A circulação da cultura entre o reator de vidro contido na incubadora e a célula calorimétrica no calorímetro foi conseguida por intermédio de uma bomba peristáltica multicanal (Ismatec MS-4/12) (13) colocada dentro da incubadora/termostato de ar (3). O fluxo nominal da bomba foi ajustado antes de cada experiência de modo a garantir um fluxo real de $1.0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, constante entre todas as experiências. Esta verificação é essencial uma vez que o fluxo se altera consoante é perdida a elasticidade dos tubos usados na bomba peristáltica e alterações no fluxo afetam diversos parâmetros calorimétricos como a constante de calibração [76], o volume efetivo da célula calorimétrica [76] ou a sensibilidade do sinal [77].

O fluxo foi determinado bombeando água destilada para um recipiente durante um período de tempo fixo (normalmente 2 minutos) e determinando a massa de água recolhida, pesando o recipiente vazio e contendo água. A densidade da água apropriada foi usada para converter o fluxo de massa em fluxo volumétrico. Com o fluxo usado, a amostra demora cerca de 2.2 minutos a chegar à célula calorimétrica e cerca de mais 2 minutos a regressar ao reator.

Todo o equipamento que compõe o calorímetro foi mantido numa sala termostatzada com ar condicionado à temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A termostatização do reator de vidro com o banho a 30°C dentro da incubadora (também esta termostatzada) permitiu uma melhor estabilização da temperatura da amostra, com menos ruído associado à abertura da porta da incubadora (3) durante o decorrer das experiências.

A potência, P , dissipada pela amostra na célula calorimétrica num dado instante t foi calculada com base na equação:

$$P = \varepsilon \times S_e \quad (1)$$

Onde S_e representa o sinal calorimétrico e ε é a constante de calibração do aparelho.

O valor de ε , foi obtido com base em calibrações elétricas realizadas mensalmente, tal como descrito em [15]. Os parâmetros da calibração elétrica (voltagem, corrente e duração), assim como a aquisição de dados durante as experiências, foram controlados por computador através do *software* CBCAL 1.0 [78]. O circuito de calibração elétrica consiste numa resistência de 50Ω colocada no interior da célula calorimétrica ligada a um multímetro Agilent 34401A e a uma fonte de tensão Agilent 6611C DC.

Resumidamente é aplicada uma corrente com intensidade constante (I) e uma diferença de potencial conhecida (V) à resistência da célula calorimétrica, durante um certo intervalo de tempo (Δt). Essa resistência vai transferir uma quantidade conhecida de energia (efeito de Joule) para a termopilha, sendo registado pelo calorímetro. Desta forma é possível estabelecer uma relação entre a potência dissipada no interior da célula calorimétrica e a intensidade do sinal da termopilha:

$$\varepsilon = \frac{P_{média} (W)}{S_e (V)} \quad ou \quad \varepsilon = \frac{Q (J)}{A_c (V.s)} \quad (2)$$

Onde $P_{média}$ representa a potência média aplicada à resistência, A_c é a área da curva calorimétrica obtida na calibração elétrica e Q é o calor total libertado pela resistência durante a calibração elétrica. Foi usado preferencialmente o primeiro método pois tem a vantagem de não incluir as zonas em que o sinal calorimétrico ainda está a estabilizar e ser independente do tempo de resposta do calorímetro pois o sinal é estacionário durante o intervalo de tempo escolhido.

Não foram encontradas diferenças significativas entre o valor da constante de calibração obtido para H_2O *millipore*, meio SC, meio YPD, meio CAA, meio CAA extra e células em estado estacionário, tendo-se usado o valor de $15.5 \pm 0.2 \mu W \mu V^{-1}$ ($n = 41$) ao longo deste trabalho.

A esterilização de todo o circuito calorimétrico foi efetuada antes de cada experiência, fazendo circular: (i) uma solução aquosa de lixívia 20% (V/V) no mínimo durante 6h, seguido de lavagens sequenciais com água *millipore*, etanol 70% (V/V) e água *millipore* novamente no mínimo durante 10 minutos cada; ou alternativamente (ii) uma solução de etanol 70% (V/V) durante um mínimo de 3h, seguido de uma lavagem dos restos celulares com água *millipore* durante um mínimo de 1h. O reator de vidro (2) foi esterilizado com o agitador magnético no seu interior por calor seco como o restante material de vidro (170 °C durante 3h no mínimo).

O volume de cultura no reator de vidro foi sempre 20 mL. Estas culturas não tiveram uma atmosfera controlada intencionalmente para mimetizar ao máximo as condições usadas nas culturas *batch* correntes

de laboratório, no entanto foi assegurada uma humidade constante colocando um recipiente aberto com água destilada dentro da incubadora.

Uma linha de base foi traçada antes de cada experiência com o meio de cultura estéril a ser usado na experiência em questão num reator de vidro, simulando exatamente as condições da cultura e apenas quando uma linha de base estável é atingida é que se colocaram as células no calorímetro. Essa linha de base assume-se ser constante em torno de um valor médio, ao longo de todo o ensaio. Normalmente o sinal calorimétrico é obtido por diferença entre o sinal da célula calorimétrica em que está a passar a amostra e o sinal de uma célula de referência (onde estaria a passar meio sem células, no entanto no nosso caso a célula de referência do calorímetro encontra-se desligada devido ao ruído introduzido por variações de fluxo entre as duas células.

3.4. Determinação do volume efetivo da célula calorimétrica

Para determinar a potência dissipada por uma cultura de células em termos de potência por célula (potência específica) ou por unidade de biomassa é necessário conhecer o volume efetivo da célula calorimétrica [79]. Este difere do volume físico da célula pois o fluxo da amostra resulta no transporte do calor para fora da zona de deteção. O volume efetivo da célula calorimétrica foi determinado a partir da reação de hidrólise do metilparabeno (MP), Figura 6, em 0.5 mol dm^{-3} hidróxido de sódio (NaOH) (foi usado um excesso de 10x NaOH para assegurar cinética de pseudo-primeira ordem), tal como em [79].

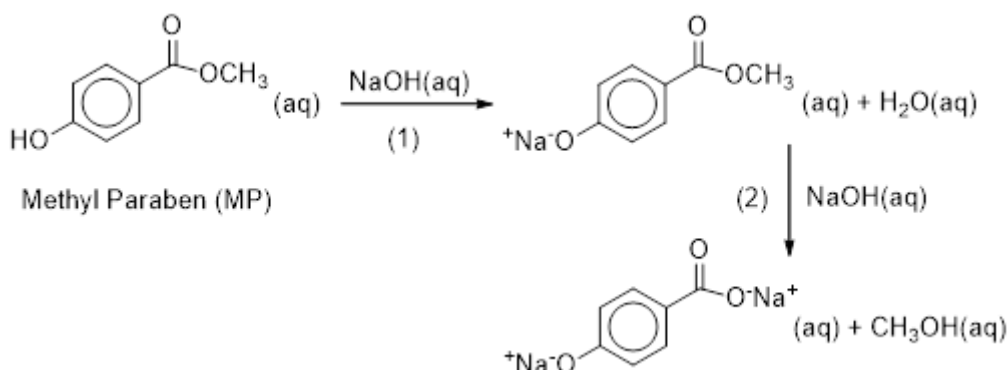


Figura 6 - Hidrólise do metilparabeno catalisada por hidróxido de sódio (base). A reação é iniciada pela adição de metilparabeno (MP) a uma solução de NaOH em excesso de 10 vezes de forma a assegurar as condições de pseudo-primeira ordem. A concentração inicial de NaOH (0.5 mol dm^{-3}) corresponde a um pH=12.7. A este pH o MP é rapidamente desprotonado durante a dissolução (1) ficando o composto essencialmente na sua forma aniónica (>99%). Tipicamente a desprotonação (1) está completa antes do MP chegar à célula calorimétrica do calorímetro de fluxo e a reação de hidrólise do MP a ser estudada no calorímetro de fluxo corresponde à fase 2 (2)

A determinação do volume efetivo (V_{eff}) é baseada no estudo cinético da reação 2 (Figura 6) baseado em informação calorimétrica. A produção de calor na célula calorimétrica à medida que ocorre a hidrólise do MP é monitorizada como fluxo de calor, ($\Delta\phi$), através da termopilha, sendo que o valor

de $\Delta\phi$ se correlaciona com a taxa de consumo do MP ou constante de pseudo-primeira ordem da reação (k) através da equação (3) [79]:

$$\Delta\phi = -F \times C_0 \times \Delta_r H_m^0 (1 - e^{-k \frac{V_{eff}}{F}}) e^{-kt} \quad (3)$$

Onde C_0 é a concentração inicial de MP, $\Delta_r H_m^0$ é a entalpia da reacção 2 e F é o fluxo real ($\text{dm}^3 \text{s}^{-1}$). A equação anterior simplifica quando $t = 0$, ficando:

$$\Delta\phi_0 = -F \times C_0 \times \Delta_r H_m^0 (1 - e^{-k \frac{V_{eff}}{F}}) \quad (4)$$

Que facilmente pode ser rearranjada de forma a calcular o volume efetivo:

$$V_{eff} = \frac{\ln\left(\frac{\Delta\phi_0}{F \times C_0 \times \Delta_r H_m^0} + 1\right)}{-k} \times F \quad (5)$$

A determinação de V_{eff} através da equação anterior requer ainda o conhecimento do k e do $\Delta\phi_0$, que são obtidos através do declive e ordenada na origem, respetivamente, do gráfico $\ln(\Delta\phi_0)$ em função do tempo:

$$\ln(\Delta\phi) = \ln(\Delta\phi_0) - kt \quad (6)$$

O $\Delta_r H_m^0$ tem de ser determinado por métodos alternativos, tendo sido usados os valores de entalpia determinados pelo nosso grupo [80] para as respetivas temperaturas: 25°C, $-50.99 \pm 0.40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 30°C, $-50.60 \pm 0.80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 34°C, $-50.02 \pm 0.05 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 37°C, $-49.64 \pm 0.90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Numa experiência típica, 20 cm^3 de uma solução aquosa de 0.5 mol dm^{-3} NaOH eram transferidos para o reator de vidro com agitação magnética e postos a circular no calorímetro através da célula calorimétrica até se obter uma linha de base estável. A reação de hidrólise era, então, iniciada através da adição de uma massa o mais próxima possível de ~0.1521g (~0.001 mol) de MP sublimado à solução de NaOH a circular no calorímetro. As curvas calorimétricas tipo obtidas para a hidrólise de MP às temperaturas de 25°C, 30°C, 34°C e 37°C encontram-se representadas na Figura 7.

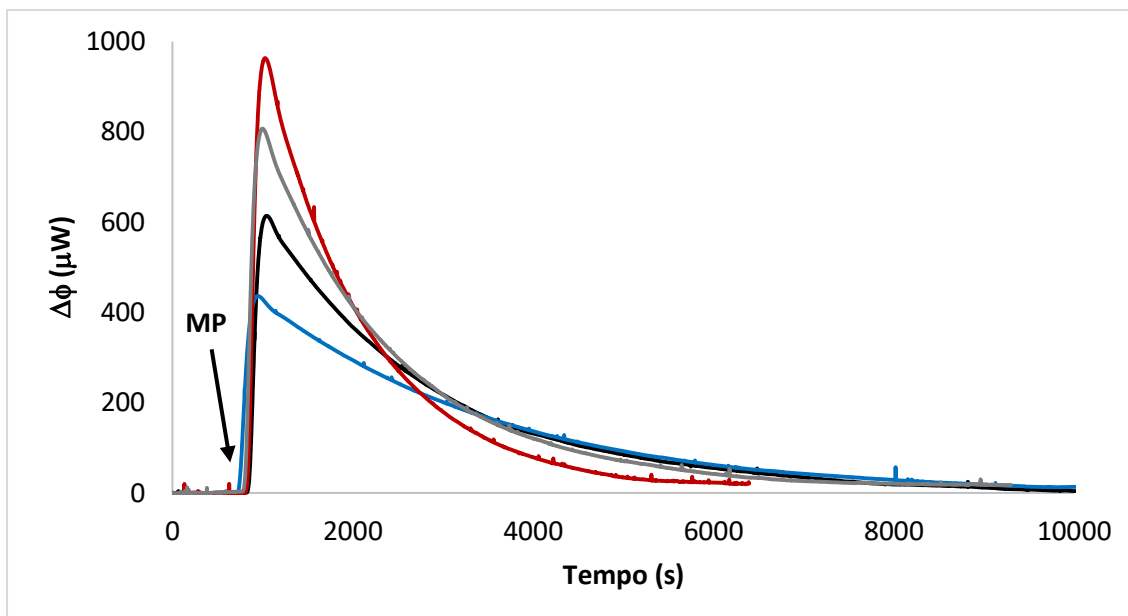


Figura 7 - Curvas calorimétricas da reação de hidrólise do metilparabeno (MP) em solução aquosa de 0.5 mol dm^{-3} hidróxido de sódio a diversas temperaturas. As temperaturas são 25°C (azul), 30°C (preto), 34°C (cinza) e 37°C (vermelho). A seta indica o tempo em que foi adicionado o MP e iniciada a hidrólise.

Como se pode observar na Figura 7 a potência máxima atingida na reação de hidrólise aumenta bastante com a temperatura e retorna à linha de base mais rapidamente, refletindo o aumento de velocidade da reação com a temperatura. Os valores de $\ln(\Delta\phi_0)$ e k são obtidos a partir de um gráfico de $\ln(\Delta\phi)$ em função do tempo, tal como já tinha sido referido anteriormente, semelhante ao representado na Figura 8.

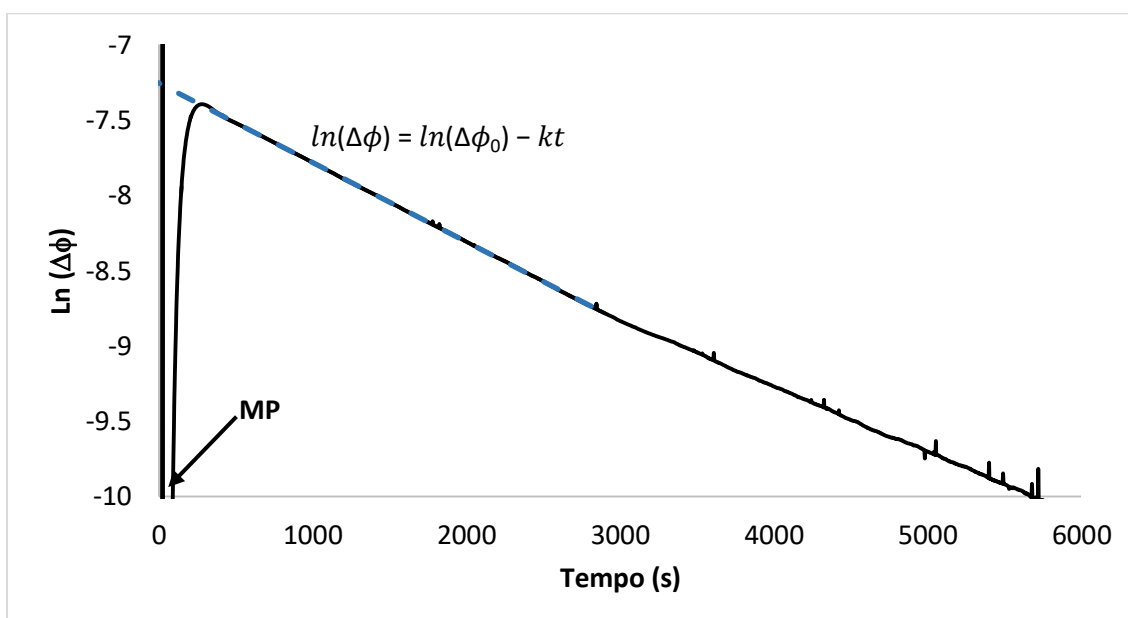


Figura 8 - Gráfico do $\ln(\Delta\phi)$ em função do tempo para a reação de hidrólise do MP. A seta indica o tempo em que ocorreu a adição de MP e se iniciou a reação.

Os resultados obtidos para a constante de velocidade da reação (k) e o volume efetivo às diversas temperaturas encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Constantes de velocidade e volume efetivo obtidos a partir da reação de hidrólise do MP em solução aquosa de 0.5 mol dm⁻³ NaOH a diversas temperaturas. O valor da temperatura é uma média ponderada entre o valor de temperatura do calorímetro (medido através de uma resistência de 4 fios junto à célula calorimétrica) e a temperatura da amostra no reator de vidro (medida através de um termistor numa configuração de 4 fios ligada a um multímetro HP34972A calibrado). Os valores encontram-se na forma de média \pm desvio padrão (número de experiências independentes).

T (°C)	$k \times 10^{-4}$ (s ⁻¹)	V_{eff} (cm ³)
24.97 ± 0.07 (n=7)	3.574 ± 0.111 (n=6)	0.537 ± 0.018 (n=6)
30.00 ± 0.05 (n=5)	5.264 ± 0.061 (n=5)	0.547 ± 0.012 (n=4)
34.01 ± 0.01 (n=7)	6.983 ± 0.139 (n=6)	0.591 ± 0.010 (n=6)
36.99 ± 0.03 (n=7)	8.570 ± 0.043 (n=6)	0.624 ± 0.006 (n=6)

Os valores de volume efetivo determinados para as diferentes temperaturas são estatisticamente diferentes entre si (P-value < 0.01), exceto entre os 24.97 °C e os 30 °C onde a diferença observada está dentro do erro experimental (P-value = 0.381). Entre 30 °C e 37 °C o volume efetivo aumenta linearmente com a temperatura (Figura S1) tendo-se obtido a seguinte correlação ($R^2=0.9999$):

$$V_{eff}(cm^{-3}) = (1.1028 \pm 0.0093) \times 10^{-2} \times T(^{\circ}C) + (2.1584 \pm 0.0314) \times 10^{-1} \quad (7)$$

O V_{eff} determinado a 25 °C encontra-se concordante com os valores descritos na literatura para o calorímetro LKB 10700-1 a essa temperatura, nomeadamente 0.5 mL [33], 0.587 mL [81] e 0.61 ± 0.07 mL [82].

O gráfico de Arrhenius obtido com os dados do Quadro 1, encontra-se representado na Figura S2. Foi obtida a seguinte correlação ($R^2=0.9997$):

$$\ln(k) = -(6720.59 \pm 75.87) \times \frac{1}{T(K)} + (14.6117 \pm 0.2491) \quad (8)$$

A partir do declive de um gráfico de Arrhenius é possível confirmar que o mecanismo da reação não se altera na gama de temperaturas usadas [82] e ainda determinar a energia de ativação (E_a) da reacção de hidrólise básica do MP:

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T(K)} + \ln(a) \quad (9)$$

Onde R é a constante dos gases perfeitos (8.31447215 J mol⁻¹ K⁻¹ – valor recomendado pela IUPAC). Rearranjando obtém-se:

$$E_a = -declive \times R = -(-6720.59 \pm 75.87) \times 8.31447215 \approx 55.9 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1} \quad (10)$$

O valor de E_a é relativamente inferior aos valores descritos na literatura para esta reação 61.6 ± 0.6 kJ mol⁻¹ [80], 63 kJ mol⁻¹ [79], 59.8 ± 0.9 kJ mol⁻¹, 60.8 ± 3.5 kJ mol⁻¹ e 60 ± 4.4 kJ mol⁻¹ [82].

A massa de MP adicionada foi obtida da diferença de massa do recipiente contendo a amostra antes e depois da adição usando para isso uma balança Mettler XS205 com uma precisão de 10 µg. O volume de NaOH adicionado foi igualmente calculado a partir da diferença da massa do reator de vidro antes e após a adição do NaOH, através da densidade da solução para a respetiva temperatura. A reação foi seguida até se obter uma linha de base estável. A diferença de temperatura entre o reator e a célula calorimétrica foi sempre inferior a 0.05°C.

O MP foi obtido da Sigma (metil 4-hidroxibenzoato, Aldrich Mass fraction >0.99; CAS number 99-76-3) e posteriormente purificado por sublimação a 338 ± 1 K, tal como descrito em [80] tendo sido usado o MP sublimado em todo o protocolo. Foram feitas análises suplementares de forma a avaliar o grau de pureza da substância (GC-MS), que foi superior a 0.999%; a sua composição elementar (análise elementar); e a determinação do polimorfo (PXRD e DSC). Informações mais detalhadas sobre a pureza do MP usado neste trabalho podem ser consultadas na referência [80].

As soluções de NaOH usadas nas experiências calorimétricas foram preparadas diluindo uma ampola com concentração certificada de 1 mol dm^{-3} NaOH (Fischer Chemical, NJ, USA) usando água *milliQ* (condutividade $<0.1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$) de um sistema Millipore.

Em todo o trabalho foi considerado o valor de $0.547 \pm 0.012 \text{ cm}^3$ (n=4) para o volume efetivo da célula calorimétrica a 30°C.

3.5. Curva de calibração de biomassa e número de células em função da densidade ótica

Para a determinação de biomassa, as células BY4741 foram crescidas em meio SC tal como descrito anteriormente. Foram retiradas amostras de 50 mL a cada hora, centrifugadas durante 5 minutos a 5000 g numa centrífuga *Eppendorf 5804 R* refrigerada a 4°C, lavadas uma vez com água destilada, centrifugadas novamente e guardadas a -20°C até serem liofilizadas. A liofilização foi feita num liofilizador *Heto PowerDry LL3000* com a duração mínima de 24h. O liofilizado foi pesado numa balança Mettler XS205 com uma precisão de 0.01 mg.

As amostras foram centrifugadas, liofilizadas e pesadas sempre em tubos Falcon. A massa do liofilizado foi obtida por diferença entre a massa do tubo Falcon vazio e contendo a amostra liofilizada. A concentração de biomassa foi obtida dividindo a massa de células liofilizadas pelo volume de amostra retirado (mg/mL). A massa dos tubos usados não se altera com a liofilização, tendo-se obtido a mesma massa para tubos controlo antes e após liofilização. Estes tubos foram limpos com etanol antes de cada medição, seguindo sempre o mesmo protocolo de limpeza, e colocando-os sempre na mesma posição na balança para aumentar a reprodutibilidade da pesagem.

A conversão de OD₆₀₀ para número de células foi realizada com base no fator $1 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1} = (2.94 \pm 0.12) \times 10^7 \text{ células mL}^{-1}$ anteriormente obtido [83] para a estirpe BY4741 nas mesmas condições de trabalho.

3.6. Determinação da concentração de glucose no meio de crescimento

A concentração de glucose foi determinada em amostras do meio de cultura com um volume de 0.8 mL (diluídas se necessário em tampão de fosfato de potássio, TFK, 0.1M e pH 7.4), recolhidas a tempos conhecidos e transferidas para a câmara de um eléctrodo de O₂ *Hansatech Oxygraph plus* (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). As determinações foram realizadas a 30°C e com agitação. Após obtenção de uma linha de base estável, 20 µL de glucose oxidase (14.5U) foram adicionados com uma seringa *Hamilton* de 25 µL. O glucose oxidase (GO) oxida especificamente a D-glucose presente no meio, consumindo oxigénio no processo. O consumo de O₂ é quantificado pelo eléctrodo de O₂. A conversão do sinal do eléctrodo em concentração de glucose foi efetuada com base numa curva de calibração previamente determinada.

Após a adição de GO há uma diminuição abrupta do sinal do eléctrodo como resposta ao consumo do O₂ na reação de oxidação, seguido de uma estabilização em que se obtém um declive constante (que pode não ser nulo desde que a curva de calibração seja traçada nas mesmas condições) quando toda a glucose é consumida ou se atinge um equilíbrio na reação enzimática, Figura 9A. A grandeza medida corresponde à diferença entre o valor do sinal imediatamente antes da adição do GO e o valor após estabilização. Nas condições descritas, a reação demora cerca de 10-15 minutos a estabilizar, o que não é muito crítico tendo em conta a velocidade de consumo de glucose pelas células. O tempo de reação pode, se necessário, ser reduzido, aumentando a quantidade de GO. As curvas de calibração obtidas revelaram uma gama de linearidade bastante alargada, estendendo-se tipicamente de 0 µM a 260 µM de glucose (depende da qualidade da membrana do eléctrodo), Figura 9B.

Este método é altamente reprodutível e específico para a glucose, nas condições usadas, não sendo perturbado por quaisquer outros componentes existentes no meio de cultura ou libertados pelas células durante o seu metabolismo (inclusive o etanol). Para além disso, determinações feitas com meio contendo células em crescimento ou com o respetivo sobrenadante produziram exatamente o mesmo resultado, indicando que o método não é perturbado pelas células. Este novo método descrito aqui pela primeira vez constitui, assim, uma alternativa fiável e rentável relativamente ao uso de dispendiosos *kits* enzimáticos.

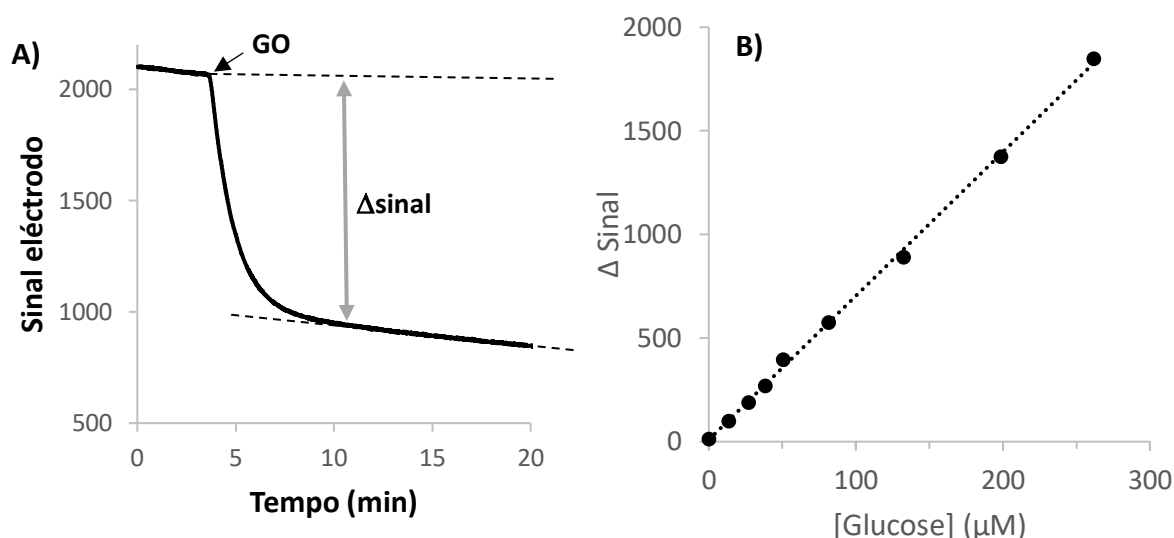


Figura 9 – Determinação da concentração de glucose do meio pelo método do Glucose oxidase. **A)** Traçado típico obtido no eléctrodo de O_2 pelo método descrito nesta secção. A seta preta indica o instante em que 20 μL de glucose oxidase (GO) foram adicionados à amostra contendo glucose. **B)** Reta de calibração tipicamente obtida por este método, onde se pode observar que a gama de linearidade vai de 0 a 260 μM de glucose, sensivelmente.

Considera-se 1 U como a quantidade de enzima necessário para a oxidação de 1 μmol de glucose por minuto.

3.7. Determinação da concentração de H_2O_2 no meio de crescimento

A concentração de H_2O_2 foi determinada a partir da libertação de O_2 , que ocorre após a adição de catalase à amostra, usando um eléctrodo de oxigénio. A quantidade de O_2 libertada na reação do catalase correlaciona-se com a concentração de H_2O_2 na amostra, através de uma reta de calibração, traçada *a priori* no próprio dia.

A quantificação do O_2 foi feita num eléctrodo de oxigénio *Hansatech Oxygraph plus* (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) com agitação magnética e termostatizado a 30 °C. As amostras (800 μL) foram transferidas para o eléctrodo à diluição necessária e assim que se atingia uma linha de base estável, 15 μL de catalase (1 mg mL^{-1} , 2000-5000 U mL^{-1}) eram adicionados à amostra. A adição de catalase provoca um aumento brusco do sinal do eléctrodo, consequência da formação de O_2 na reação enzimática, estabilizando de seguida a um valor mais elevado. Este desnível é proporcional à quantidade de O_2 libertada e é a variável usada para a reta de calibração (em função da concentração de H_2O_2) e para a determinação da concentração de H_2O_2 de amostras desconhecidas.

A diluição das amostras era feita em tampão TFK. Após cada medição, a câmara do eléctrodo era lavada várias vezes com água destilada para remover todo o catalase. Este método encontra-se descrito em detalhe na referência [72].

Considera-se 1 U como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

3.8. Determinação do consumo de O₂ no meio de crescimento

A taxa de consumo de oxigénio foi medida transferindo 0.8 mL de uma cultura de *S. cerevisiae* para um elétrodo de oxigénio, *Hansatech Oxygraph plus* (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK), termostaticado a 30°C. A determinação do zero da escala (0% O₂) foi feita com uma purga de N₂ ou, alternativamente, com adição de GO a uma solução concentrada de glucose. A determinação da concentração correspondente a 21% O₂ (230 mM) foi realizada transferindo 0.8 mL de água destilada saturada com ar para a câmara do elétrodo. A água destilada foi saturada a 30°C, previamente, fazendo borbulhar ar comprimido até esta saturar.

A conversão da variação de sinal por unidade de tempo para consumo de O₂ por unidade de tempo foi feita multiplicando por uma constante de calibração (mM sinal⁻¹):

$$\varepsilon = \frac{230\text{mM}}{\text{Sinal } 21\% - \text{Sinal } 0\%} \quad (11)$$

3.9. Determinação da sobrevivência da *S. cerevisiae* ao H₂O₂

As células de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio SC tal como descrito anteriormente até à densidade celular pretendida, 0.25 OD₆₀₀. Em seguida, a cultura foi separada em duas frações: uma fração de controlo e outra em que as células foram expostas a H₂O₂. O H₂O₂ foi adicionado à concentração desejada numa única adição *bolus*, adicionando-se um volume idêntico de H₂O ao controlo. As células foram incubadas durante 90 minutos (duração aproximada de um ciclo celular em crescimento exponencial) e após este período foi avaliada a viabilidade celular das culturas expostas ao H₂O₂ comparativamente ao controlo. Essa avaliação baseou-se na capacidade das células em formar colónias em placas de YPD contendo 2% (m/v) agarose.

As placas foram colocadas numa estufa a 30°C pelo menos 30 minutos antes do plaqueamento, a termostaticar. Resumidamente, aos 90 minutos foram transferidos 100 µL das culturas expostas ao H₂O₂ e controlo, em triplicado (usando sempre um ponta nova por cada replicado), para tubos *Eppendorf* estéreis com 900 µL de água estéril. As restantes diluições foram realizadas em série, da mesma forma, até uma diluição de 10⁻³ (para as concentrações mais letais de H₂O₂ ≥800 µM) ou 10⁻⁴ (controlo e doses menos letais ≤650µM). Utilizou-se sempre a mesma ponta por replicado, tendo o cuidado de pipetar e despejar a amostra no mesmo tubo várias vezes (lavagem da ponta) e agitar no vórtex entre cada diluição. O plaqueamento foi sempre realizado após concluídas todas as diluições.

A diluição mais adequada a cada concentração era transferida para placas de YPD divididas (marcadas no verso) em 6 quadrantes. Em cada um desses quadrantes eram aplicados, com uma

micropipeta, 20 μL de cada triplicado, divididos por 20 a 30 microgotas conforme descrito em [84]. As placas eram colocadas numa estufa (viradas para cima para as gotas não se deslocarem) a 30°C e a contagem do número de colónias foi feita cerca de 48 horas depois. Este método de espalhamento das células na placa revelou-se mais vantajoso do que o espalhamento com esferas de vidro, uma vez que menos células ficam agarradas às paredes da placa e uma maior reprodutibilidade é alcançada. O processo tem ainda a vantagem de consumir menos placas por ensaio pois os triplicados de controlo e tratamento são todos plaqueados numa única placa.

A viabilidade celular foi calculada como o número de colónias formadas durante 48 horas na cultura tratada (mediana dos triplicados) a dividir pelo número de colónias presentes no controlo (mediana dos triplicados), sendo este resultado apresentado na forma de percentagem.

Conforme mencionado, para ter em conta o efeito de diluição associado à adição de H_2O_2 nas culturas expostas ao H_2O_2 , foi adicionado o mesmo volume de água estéril (normalmente usou-se a mesma água usada para produzir a solução *stock* de H_2O_2) às culturas controlo. O H_2O_2 foi preparado no próprio dia da experiência, a uma concentração tal que a adição à cultura nunca representasse uma variação no volume superior a 1%. Por exemplo, para estudar o efeito de 1mM de H_2O_2 numa cultura com 10 mL, o *stock* de H_2O_2 era preparado a uma concentração próxima de 100mM, sendo a sua concentração confirmada pela mediação da $\text{Abs}_{240\text{nm}}$ (devidamente diluído, considerando um coeficiente de absorção molar de 43.4 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [72]), e o volume de H_2O_2 adicionado 100 μL (dependendo da concentração real do *stock* de H_2O_2).

A solução *stock* de H_2O_2 foi preparada a partir de uma solução concentrada de 9.79M de H_2O_2 , usando sempre H_2O estéril para a diluição; a solução foi sempre protegida da exposição à luz com folha de alumínio e protegida do calor mantendo-a em gelo ou no frigorífico.

3.10. Efeito do H_2O_2 na curva calorimétrica do crescimento de *S. cerevisiae*

As culturas foram inoculadas à densidade celular de 0.035 OD_{600} em meio SC a partir de uma pré-cultura em fase estacionária crescida durante a noite. Após a inoculação 20 mL dessa cultura foram transferidos para um reator de vidro do sistema calorimétrico (2 na Figura 5) contendo um agitador magnético. Reator e agitador magnético foram previamente esterilizados. O restante volume da cultura foi mantido num *erlenmeyer* e colocado numa incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen, enquanto a cultura do reator de vidro foi transportada o mais rapidamente possível (cerca de 5 minutos) para a incubadora do calorímetro e posta a circular no circuito calorimétrico. A cultura a crescer na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen foi usada como referência para a densidade celular da cultura no calorímetro, sendo que o crescimento celular em ambas as condições é igual. O H_2O_2 foi adicionado sempre aos 0.25 OD_{600} através de uma bureta automática (Crison Multi-burette 4S) controlada por

computador e equipada com uma seringa *Hamilton* com capacidade de 1mL, tendo este sistema uma precisão superior a 1 μ L [85]; ou alternativamente usando uma micropipeta, sendo este o método preferido, dado que a bureta por vezes pingava devido a fugas de ar e o volume adicionado era afetado. A adição em qualquer dos casos foi feita sem retirar as células do calorímetro destapando ligeiramente o reator no termostato de ar, adicionando o H₂O₂ e voltando a tapar o reator o mais rapidamente possível para evitar contaminações; nos casos em que se usou a bureta automática, o tubo de teflon que permite a injeção de H₂O₂ foi introduzido no reator (desviando o tampão de gaze ligeiramente) e programou-se a adição no computador. Assim que a adição estava concluída, retirava-se imediatamente o tubo de teflon do reator para não pingar mais H₂O₂ na cultura.

A bureta automática foi lavada antes de qualquer adição com água milliQ, realizando à volta de 10 ciclos de enchimento e esvaziamento da seringa. Para evitar diluições do H₂O₂ na seringa e tubos, fez-se o mesmo protocolo de lavagem fazendo passar H₂O₂ (*stock*) pela seringa e tubos. O H₂O₂ durante a lavagem e as adições esteve sempre protegido da luz e do calor.

A solução *stock* de H₂O₂ usada foi preparada tal como na secção 3.9, inclusive a escolha da concentração do *stock* consoante a concentração que se pretende estudar.

3.11. Cinética de morte da *S. cerevisiae* a uma dose letal de H₂O₂

As culturas foram preparadas tal como descritas anteriormente. Quando a densidade celular atingia os 0.25 OD₆₀₀ era realizada uma diluição da cultura com meio fresco (termostatizado a 30°C para não perturbar o crescimento) para uma densidade 0.0125 OD₆₀₀. O objetivo desta diluição é diminuir o número de células na amostra e assim reduzir o consumo de H₂O₂, aproximando estas condições às de um estado estacionário. A cultura diluída (0.0125 OD₆₀₀) foi dividida em duas: uma cultura foi adaptada através da exposição a uma dose subletal de H₂O₂ (150 μ M), enquanto a outra não foi adaptada (foi adicionado igual volume de água estéril como controlo de tratamento). Ambas as culturas foram incubadas a 30°C com agitação durante 90 minutos e ao fim desse tempo (~0.025 OD₆₀₀), cada uma dessas culturas foi dividida em duas: uma cultura de controlo e uma tratada. À cultura tratada foi adicionada uma dose de 1mM H₂O₂ e ao controlo igual volume de água estéril. A viabilidade celular das culturas expostas ao H₂O₂ (adaptadas e não adaptadas) foi acompanhada ao longo do tempo após a adição da dose letal de H₂O₂ em intervalos de 30 minutos durante as primeiras 2 horas e depois em intervalos de 1 hora até às 6 horas. Os CFU mL⁻¹ no tempo zero foram ensaiados antes da adição da dose de 1mM H₂O₂. A viabilidade celular foi avaliada quantitativamente como o número de colónias formadas em placa de YPD por volume de cultura inicial transferido (teve-se um cuidado extra em garantir que as pipetas se encontravam bem calibradas), sendo o protocolo usado no plaqueamento igual ao descrito na secção 3.9. Além de se acompanhar a viabilidade celular das culturas expostas ao H₂O₂ ao longo do tempo, foi também analisada a viabilidade celular aos 90 minutos relativamente ao respetivo

controlo (adaptadas-tratamento/adaptadas-controlo e não adaptadas-tratamento/não adaptadas-controlo).

Neste protocolo teve-se o cuidado de termostatar todo o material que contactou com as células durante os diversos tratamentos, incluindo meios de cultura, pipetas estéreis de vidro, *erlenmeyers* estéreis e placas de YPD.

Este protocolo foi realizado em meio SC para a estirpe *wt* e em meio CAA para a estirpe ZWF1D, uma vez que esta apresenta um crescimento deficiente em meio SC.

Em situações em que as culturas não foram feitas de forma emparelhada: as culturas não adaptadas foram diluídas diretamente de 0.25 OD₆₀₀ para 0.025 OD₆₀₀, sem o período de 90 minutos de incubação necessários para a adaptação celular ao H₂O₂ e a adição de 1mM H₂O₂ foi feita de imediato.

A quantificação das áreas das colónias (fotografias) foi feita exatamente 24 horas após o respetivo plaqueamento recorrendo para tal a uma lupa *Olympus SZX10 stereoscopic microscope* equipada com uma câmara *ColorView Soft Imaging System* controlada pelo *software* Cell[^]D© 2.6, sendo guardadas imagens em formato digital das colónias aos respetivos tempos (0h, 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h) após o tratamento de H₂O₂. A determinação das áreas das colónias guardadas nas fotografias foi feita através do *software* ImageJ [86]

A aproximação ao estado estacionário usada neste protocolo foi eficiente, sendo o consumo de H₂O₂ nas 6 horas subsequentes à adição de 1mM H₂O₂ praticamente inexistente (dados não apresentados). Isso foi confirmado num ensaio enzimático baseado na libertação de O₂ causado pela adição de catalase à cultura, sendo essa libertação quantificada num elétrodo de O₂ e proporcional à concentração de H₂O₂ na cultura, conforme descrito em [72].

3.12. Exposição de *S. cerevisiae* a adições *bolus* subletais de H₂O₂

As culturas foram preparadas exatamente como na secção 3.10, com a diferença de terem sido feitas 3 adições *bolus*, todas de 150 µM H₂O₂, espaçadas de 40 minutos entre si. A primeira adição foi feita à densidade habitual de 0.25 OD₆₀₀ garantindo assim as mesmas condições de resistência ao *stress* oxidativo dos ensaios anteriores, uma vez que este se altera ao longo da fase exponencial [12]. A densidade ótica foi acompanhada através de uma cultura emparelhada a crescer na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen. Esta cultura pouco antes dos 0.25 OD₆₀₀ foi dividida em duas frações, emparelhadas: uma de controlo e outra sujeita às adições *bolus*. Os OD₆₀₀ dessas duas culturas foram acompanhados até ao fim da fase exponencial e da curva calorimétrica.

Um segundo protocolo foi feito usando meio CAA extra em vez do meio SC como forma de testar se os efeitos na curva calorimétrica pelo protocolo anterior eram dependentes da resposta a uma situação de fome gerada em meio SC. O meio CAA extra é igual ao CAA mas suplementado com o dobro da

concentração de uracilo e o triplo da concentração de YNB. Este protocolo foi idêntico ao anterior com a exceção de que as células sujeitas às adições *bolus* de H_2O_2 foram transportadas para o calorímetro aos $\sim 0.2 \text{ OD}_{600}$ (pouco antes dos 0.25 OD_{600}) de forma a garantir que as adições *bolus* eram feitas à densidade celular pretendida. Contudo, as culturas controlo foram crescidas no calorímetro a partir de 0.035 OD_{600} , uma vez que não houve necessidade de fazer qualquer adição a nenhuma densidade celular.

3.13. Estatística

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho referem-se a médias do número, n , de experiências independentes indicado entre parêntesis e as incertezas associadas correspondem a desvios padrão dessas médias. A análise estatística dos resultados foi feita recorrendo ao teste T de *Student* assumindo uma distribuição bicaudal (salvo indicação contrária). A diferença entre valores médios foi considerada estatisticamente significativa quando $p\text{-value} < 0.05$ (*, $p\text{-value} < 0.05$; **, $p\text{-value} < 0.01$; ^{NS}, não significativo ($p\text{-value} > 0.05$)).

4. Resultados e discussão

4.1. Curvas calorimétricas do crescimento de *S. cerevisiae*

Com o objetivo de estudar o papel que diferentes meios de cultura podem desempenhar no crescimento e metabolismo de *S. cerevisiae*, foram feitas culturas desta levedura em dois meios de cultura distintos: um meio rico YPD e um meio sintético completo (SC). As culturas foram acompanhadas ao longo do tempo, quer calorimetricamente, quer por determinações de densidade celular baseadas em medidas espectrofotométricas de densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀). Estas medições permitiram exprimir a resposta calorimétrica tanto em termos da população total como de um valor médio por célula.

Para testar se o metabolismo na fase exponencial é uniforme, começou-se por monitorizar o crescimento das culturas de *S. cerevisiae* em meio SC. A Figura 10A mostra uma sobreposição de uma curva calorimétrica representando a potência libertada pelo total da população celular em função do tempo e a curva de OD₆₀₀, registada em paralelo.

A potência dissipada (P) é derivada do sinal calorimétrico em ordem ao tempo e é o resultado do calor produzido pela população celular por unidade de tempo. O perfil calorimétrico resultante começa com uma fase *lag*, que dura aproximadamente $2.08 \pm 0.12\text{h}$ ($n = 10$), durante a qual as leveduras se adaptam ao novo meio de cultura, tendo de sintetizar toda a maquinaria enzimática necessária para o crescimento exponencial que se segue, caracterizada por uma taxa de divisão praticamente nula, $0.029 \pm 0.029\text{ h}^{-1}$ ($n = 11$). Durante esta fase, a potência dissipada é baixa como resultado do baixo número de células durante esta fase. Após a fase *lag* inicia-se uma fase em que a densidade celular e a potência dissipada aumentam de forma exponencial ao longo do tempo, Figura 10A, correspondendo à fase exponencial do crescimento de *S. cerevisiae*. Durante esta fase as células apresentam uma taxa de divisão rápida, $0.451 \pm 0.014\text{ h}^{-1}$ ($n = 7$).

Informação adicional pode ser obtida a partir da potência específica, SP , que é obtida dividindo P pelo número de células presente na célula calorimétrica, no momento:

$$SP = \frac{P}{n.^{\circ} \text{ células}} = \frac{P \text{ (pW)}}{OD_{600} \cdot \text{mL}^{-1} \times \frac{\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}}{OD_{600} \cdot \text{mL}^{-1}} \times V_{eff}(\text{mL})} \quad (12)$$

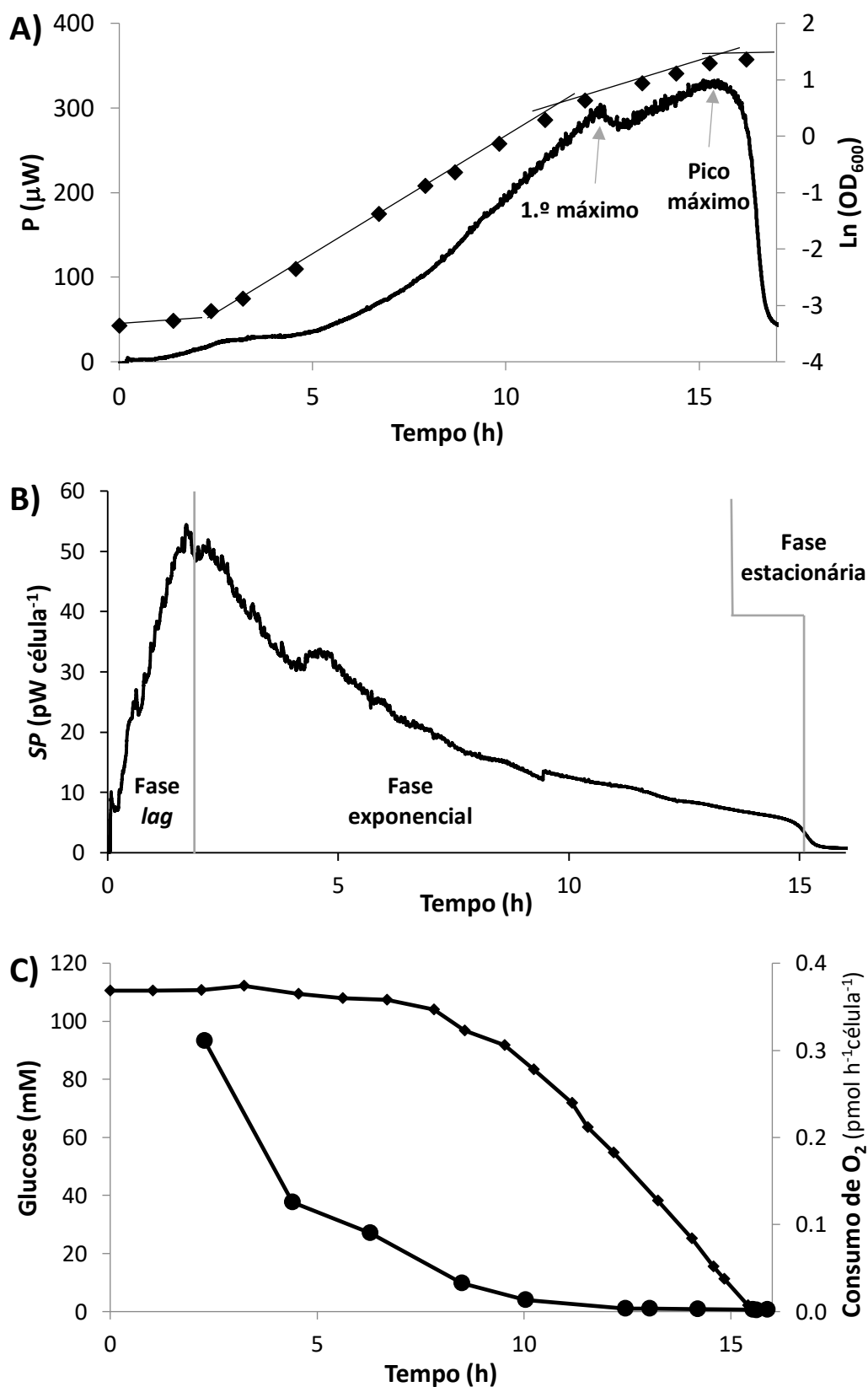


Figura 10 – Dinâmica metabólica do crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC. **A)** Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio sintético completo (SC): (—) potência dissipada pela população (P); (◆) logaritmo de OD_{600} . **B)** Potência específica (SP) de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC. A potência específica é calculada como a P dissipada pela população total normalizada pelo número de células. **C)** Concentração de glucose no meio de cultura (◆) e velocidade de consumo de O_2 (●) durante o crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC.

O padrão de *SP* (Figura 10B) é completamente diferente do perfil calorimétrico da população, fornecendo detalhes acerca da dinâmica metabólica ao longo das várias fases de crescimento. Apesar da fase *lag* ser a que apresenta uma menor potência *P* dissipada pela população, os maiores valores de *SP*, $52.45 \pm 7.39 \text{ pW célula}^{-1}$ ($n = 7$) são atingidos durante a transição desta fase para a fase exponencial. Isto indica que o metabolismo é energeticamente mais dissipativo neste período. Tal já havia sido previsto anteriormente [17] [87], contudo nunca tinha sido confirmado experimentalmente. Após a fase *lag*, há uma diminuição brusca de *SP*, sendo o metabolismo cada vez menos dissipativo ao longo da fase exponencial. Isto é consistente com o facto de durante a fase *lag*, o metabolismo ser predominantemente respiratório [20] e passar a respiro-fermentativo [88] (predominantemente fermentativo) na fase exponencial. De facto a entalpia associada à respiração ($-2812 \text{ kJ mol}^{-1}$) [36] é consideravelmente superior à entalpia do metabolismo fermentativo ($-97.2 \text{ kJ mol}^{-1}$) [36]. A diminuição brusca de *SP* que se observa no início da fase exponencial corresponde, provavelmente, à adaptação das células a um metabolismo predominantemente fermentativo.

Subsequentemente, os valores de *SP* continuam a diminuir progressivamente até se observar nova queda abrupta para um nível basal, definido pelo metabolismo mínimo das células, no início da fase estacionária. Existe uma grande variação nos valores de *SP* ao longo da fase exponencial: decrescendo de $52.45 \pm 7.39 \text{ pW célula}^{-1}$ ($n = 7$) no início até $6.22 \pm 0.45 \text{ pW célula}^{-1}$ ($n = 8$) no fim. O crescimento exponencial é, assim, uma fase altamente dinâmica com alterações metabólicas contínuas e não uma fase uniforme com um metabolismo em estado estacionário por parte da população como é geralmente assumido, confirmando resultados anteriores [12].

Uma possível explicação para a diminuição do *SP* ao longo da fase exponencial poderá estar associada à diminuição do metabolismo respiratório ao longo desta fase, anteriormente descrito em [12]. Na Figura 10C é possível observar que de facto, há uma diminuição do consumo de O_2 por célula ao longo da fase exponencial. Se se assumir que o consumo de O_2 é exclusivamente devido à respiração celular, então a fração de glucose que é oxidada via metabolismo oxidativo é cada vez menor, possivelmente como consequência da repressão gradual do metabolismo oxidativo exercida pela glucose (efeito de *Crabtree*) tornando o metabolismo gradualmente mais fermentativo [89] [32].

Face a estas observações torna-se evidente a necessidade de ter em conta que a fase exponencial não é dotada de um metabolismo estacionário e que esse fator pode afetar resultados obtidos nesta fase do ciclo celular.

4.2. Meio sintético completo falha em proporcionar um crescimento exponencial uniforme

A estirpe BY4741 (usada em todo o trabalho) é sensível ao meio de cultura usado [90] [91]. Para testar se o meio influencia a curva *SP*, foi seguida a curva de crescimento da *S. cerevisiae* ao longo do tempo quando crescida num meio rico, YPD, vulgarmente usado para crescer esta levedura (Figura 11). O meio YPD é mais rico que o meio SC, permitindo sustentar taxas de crescimento mais elevadas. O meio YPD é composto por extrato de levedura, peptona e D-glucose, apresentando a desvantagem, relativamente ao meio SC, de não ter uma composição bem definida e não permitir seleções baseadas em marcadores auxotróficos.

Apesar do comportamento em ambos os meios ser semelhante, existem diferenças no fim da fase exponencial, quer na curva de crescimento dos OD₆₀₀, quer na curva calorimétrica.

A principal diferença ao nível dos OD₆₀₀ é que em meio YPD o crescimento exponencial apresenta a mesma taxa de crescimento ($0.526 \pm 0.020 \text{ h}^{-1}$ ($n = 4$)) ao longo de toda a fase exponencial, enquanto em meio SC, ao fim de $9.16 \pm 0.16 \text{ h}$ ($n = 6$) ocorre uma diminuição súbita da taxa de crescimento de $0.451 \pm 0.014 \text{ h}^{-1}$ ($n = 7$) para $0.262 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$ ($n = 9$), cerca de metade. Isto ocorre, possivelmente, devido ao esgotamento de algum componente do meio.

Tal como se pode observar na Figura 11A, o perfil calorimétrico em meio YPD apresenta semelhanças com o obtido em meio SC: apresenta uma fase *lag* inicial durante a qual a potência dissipada é baixa, seguindo-se uma fase exponencial em que a potência dissipada aumenta exponencialmente ao longo do tempo. No entanto, para além destas semelhanças, é evidente que os padrões produzidos pelo crescimento das leveduras em ambos os meios de cultura não são idênticos no final da exponencial: em meio SC existem dois máximos calorimétricos, enquanto em meio YPD existe apenas um.

A *P* máxima dissipada por uma população de *S. cerevisiae* em meio YPD, $662 \pm 11 \mu\text{W}$ ($n = 4$), é muito superior à dissipada em meio SC, $365 \pm 17 \mu\text{W}$ ($n = 5$), sendo que neste último caso, esse máximo ocorre cerca de 1.8 h mais tarde. Contudo, as entalpias associadas ao consumo de glucose em meio SC e em meio YPD não são diferentes (Quadro 2). Isto acontece pois, apesar das culturas em meio SC dissiparem menos energia do que as crescidas em meio YPD, elas passam mais tempo próximo da sua potência máxima, o que acaba por conduzir a um valor de integral semelhante para a curva calorimétrica, isto é, uma entalpia de crescimento semelhante.

O primeiro máximo que surge na curva calorimétrica em meio SC (Figura 10A) juntamente com a mudança de declives, que ocorre pouco antes na curva de OD₆₀₀ (9h), poderia ser interpretado erradamente como uma mudança diáuxica [83], originada pelo esgotamento da glucose no meio. O primeiro máximo refletiria, assim, a adaptação das células à utilização do etanol como nova fonte de carbono. No entanto, uma determinação da concentração de glucose no meio de cultura ao longo da

curva de crescimento permitiu excluir esta hipótese, Figura 10C, sendo a concentração de glucose igual a 60.9 ± 1.4 mM ($n = 4$) nesta fase. Curiosamente é possível observar que a concentração de glucose no meio decresce linearmente ao longo do tempo, o que normalmente se observa em condições de carência de nutrientes auxotróficos [29] [22]. Isto sugere que o meio de cultura SC usado apresenta déficit de algum dos seus constituintes. Além de ainda haver glucose presente no meio, o metabolismo continua a ser sobretudo fermentativo com baixo consumo de O_2 (Figura 10C) dissipando ainda menos energia por célula do que nas primeiras 11 h de crescimento (Figura 10A).

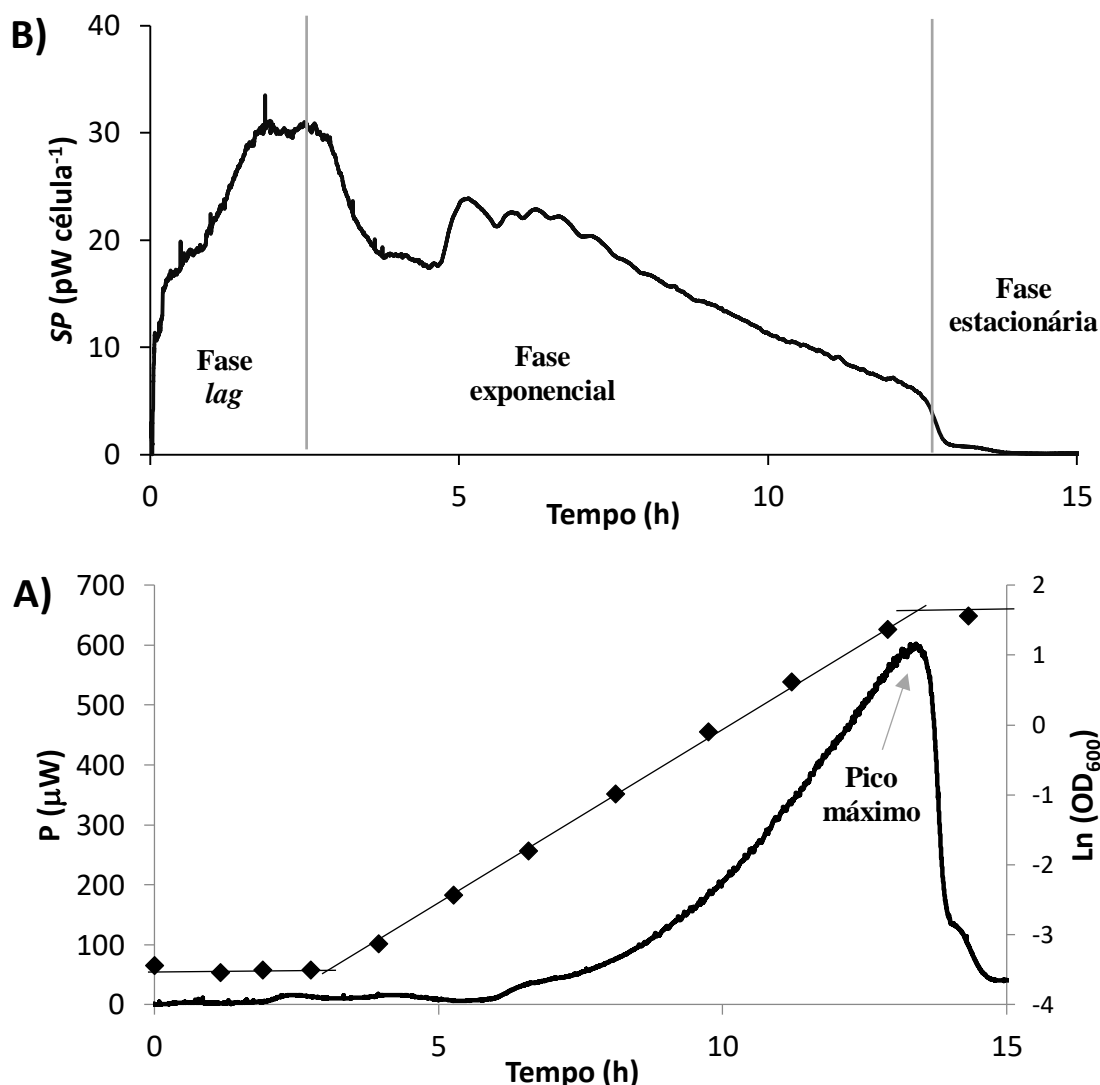


Figura 11 - Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico YPD. **A)** Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio YPD: (—) potência dissipada pela população (P); (♦) logaritmo de OD_{600} . **B)** Potência específica de *S. cerevisiae* a crescer em meio YPD. A potência específica é calculada como a P dissipada normalizada pelo número de células.

Relativamente ao perfil de SP , Figura 11B, qualitativamente é semelhante ao obtido em meio SC (Figura 10B), com o máximo, 31.24 ± 3.72 $pW \text{ célula}^{-1}$ ($n = 4$), a ocorrer na transição entre as fases *lag*-exponencial. Durante a fase exponencial, após a diminuição inicial abrupta que se segue à fase *lag*, os valores de SP também diminuem continuamente, tal como no meio SC, sem nunca estabilizar. Os valores de SP variam entre 20.2 ± 5.3 $pW \text{ célula}^{-1}$ ($n = 5$) no início da fase exponencial (após a diminuição

abrupta do *SP*) e 6.9 ± 1.0 pW célula⁻¹ (n = 6) no final da fase exponencial. Estes resultados são indicativos que a não-uniformidade desta fase do ciclo celular não é dependente do meio de cultura usado, apenas os valores absolutos de *SP* são sensíveis a este fator.

Os valores de *P* e *SP* para ambos os meios encontram-se resumidos no Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados calorimétricos referentes ao crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC e YPD. A entalpia (ΔH) associada ao crescimento de *S. cerevisiae* em 2% (m/v) glucose foi determinada através do integral das curvas calorimétricas desde a fase lag, até ao referido ponto e dividiu-se pelo volume efetivo da célula calorimétrica, de forma a poder comparar com valores obtidos por outros sistemas calorimétricos. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n), onde n representa o número de experiências independentes. **, p-value < 0.01; ^{NS}, não significativo (p-value > 0.05)

	Meio SC			Meio YPD		
	Tempo (h)	P (μ W)	ΔH (kJ dm ⁻³)	Tempo (h)	P (μ W)	ΔH (kJ dm ⁻³)
1.º máximo	11.77 \pm 0.45 (n = 5)	316 \pm 11 (n = 5)	7.38 \pm 0.19 (n = 4)	-	-	-
Pico máximo	14.91 \pm 0.52 (n = 5)	365 \pm 17 (n = 5)	14.19 \pm 0.54 (n = 4)	13.09 \pm 0.24 (n = 5) **	662 \pm 11 (n = 4) **	13.44 \pm 0.89 (n = 4) ^{NS}
Fase estacionária	16.60 \pm 0.56 (n = 5)	35 \pm 4 (n = 5)	16.83 \pm 0.42 (n = 4)	14.65 \pm 0.25 (n = 5) **	35 \pm 12 (n = 4) ^{NS}	15.96 \pm 0.82 (n = 4) ^{NS}
	<i>SP</i> (pW célula⁻¹)			<i>SP</i> (pW célula⁻¹)		
Fim da fase lag	52.45 \pm 7.39 (n = 7)			31.24 \pm 3.72 (n = 4) **		
Início da exponencial	26.33 \pm 1.45 (n = 6)			20.2 \pm 5.3 (n = 5) ^{NS}		
Fim da exponencial	6.22 \pm 0.45 (n = 8)			6.9 \pm 1.0 (n = 6) ^{NS}		

Estes dados evidenciam a incapacidade do meio SC em proporcionar uma fase exponencial com uma divisão rápida e constante das células, durante toda a sua extensão, mesmo com uma concentração de glucose significativa presente no meio. Isto pode estar relacionado com as auxotrofias da estirpe BY4741 (Y00000; *wild-type*, genótipo MATa, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *ura3 Δ 0*) [29] [90] ou dever-se a outra limitação nutricional no meio.

Apesar de desconhecida a origem do primeiro máximo nas curvas calorimétricas de *S. cerevisiae* em meio SC (Figura 10A), as observações seguintes, já anteriormente descritas, levam a crer que ele pode ter origem nalguma deficiência nutricional do meio de cultura: diminuição linear da concentração de glucose ao longo da fase exponencial (Figura 10C); incapacidade das células apresentarem fase pós-diáuxica em meio SC, quando apresentam em YPD; e mudança de taxa de crescimento durante a fase exponencial. Isso motivou a identificação dos nutrientes responsáveis por esta limitação, investigando-se em particular o efeito da metionina e do inositol.

4.2.1. Suplementação de metionina no meio SC é insuficiente para proporcionar um metabolismo unifásico na fase exponencial

O meio SC, aquando do primeiro máximo da curva calorimétrica, não está limitado pela sua fonte de carbono (glucose), Figura 10C, restando então duas hipóteses: o meio está limitado na sua fonte de azoto e/ou vitaminas (YNB) ou nos suplementos de aminoácidos. De forma a testar a segunda hipótese, preparou-se um meio de cultura idêntico ao meio SC em termos de fontes de carbono, azoto e vitaminas, mas com um suplemento de aminoácidos de caseína (meio CAA), o que lhe confere um largo excesso de aminoácidos.

Na Figura 12, pode-se observar que a curva calorimétrica da *S. cerevisiae* a crescer em meio CAA apresenta apenas um máximo tal como em meio YPD. O máximo ocorre, no entanto, mais tarde (13.32 ± 0.08 h ($n = 2$)) e a correspondente potência máxima é inferior, 519 ± 31 μ W ($n = 2$), à atingida em meio YPD (662 ± 11 μ W ($n = 4$)). Contudo este máximo é significativamente superior ao pico máximo do meio SC (365 ± 17 μ W ($n = 5$)), ocorrendo também mais cedo (14.91 ± 0.52 h ($n = 5$)).

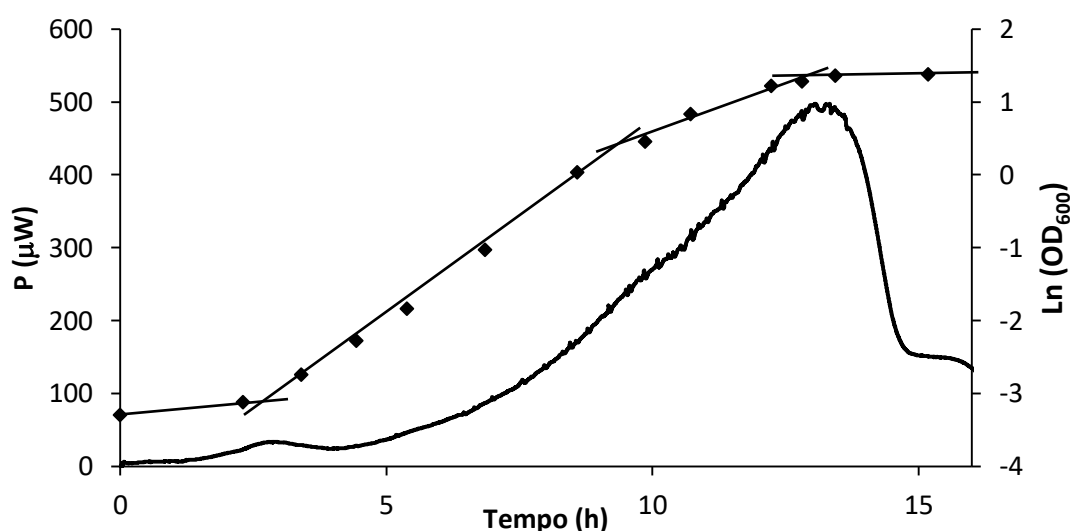


Figura 12 - Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC suplementado com aminoácidos de caseína (CAA). Representam-se o logaritmo do OD_{600} (◆) e a potência dissipada pela população (—).

O facto de um suplemento de aminoácidos ser suficiente para fazer desaparecer o primeiro máximo da curva calorimétrica da *S. cerevisiae* a crescer em meio SC é suficiente para afirmar que este máximo deriva de uma deficiência de aminoácidos do meio SC. Contudo mesmo num meio CAA, extra suplementado em aminoácidos, a fase exponencial continua a não ter uma taxa de crescimento constante a partir das 9h, exatamente como no meio SC. Isto é indicativo de que a variação da taxa de crescimento durante a fase exponencial e o primeiro pico da curva calorimétrica têm origem em fenómenos distintos.

Ao contrário do meio YPD, a composição em aminoácidos do meio CAA é conhecida (**Quadro 3**). Comparando a composição do meio CAA, com a do meio SC, é possível constatar que a quantidade de bases é exactamente a mesma. Portanto as bases adenina e uracilo (nutriente auxotrófico) não são

responsáveis pelo primeiro pico que surge na curva calorimétrica do crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC. Pode ainda ser excluído o esgotamento de glutamato, uma vez que este aminoácido nem se encontra presente no meio CAA.

Quadro 3 - Composição em aminoácidos e bases azotadas dos meios SC e CAA. Os marcadores auxotróficos da estirpe auxotrófica usada neste trabalho, BY4741, encontram-se destacados a negrito, os aminoácidos não-essenciais encontram-se a cinzento e os aminoácidos pertencentes à mistura SC mix encontram-se assinalados com * (asterisco). A concentração de aminoácidos do meio SC teórico foi calculada considerando o rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) médio determinado de $0.139 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ (média convertida dos valores obtidos na secção 4.3) e através da composição média em aminoácidos da biomassa ($Y_{aa/X}$) de levedura descrito em [92] e [93]. A concentração foi calculada da seguinte forma: $[aa]_{\text{teórico}} = Y_{X/S} \times Y_{aa/X} \times 20 \text{ g}_{\text{glucose}} \text{ L}^{-1}$

	Meio SC (mg L ⁻¹)	Meio CAA (mg L ⁻¹)	SC teórico (mg L ⁻¹)	SC mínimo [28] (mg L ⁻¹)
Adenina	25	25	20	-
Uracilo	25	25	50	40
Triptofano	50	90	16	-
Histidina	100	162	30	35
Leucina	100	522	100	110
Serina	400	336	64	375
Treonina	200	258	64	200
Arginina*	20	210	72	-
Metionina*	20	156	21	40
Tirosina*	30	318	50	-
Isoleucina*	30	294	67	-
Lisina*	30	450	107	120
Fenilalanina*	50	288	57	50
Valina*	150	372	86	-
Aspartato*	100	396	96	-
Glutamato*	100	-	116	100

NOTA: O cálculo da concentração de aminoácidos necessária para crescer a BY4741 sem limitações nutricionais no meio foi feito assumindo o rendimento em biomassa da estirpe BY4741, mas assumindo uma composição em aminoácidos da biomassa de estirpe protrófica. Os valores determinados poderão portanto divergir da realidade pois o efeito das auxotrofias poderá ter efeitos imprevisíveis nessa composição, nomeadamente nos aminoácidos auxotróficos.

De entre os aminoácidos restantes, que podem ser a causa do primeiro máximo na curva calorimétrica em meio SC, deu-se especial atenção a (i) leucina e metionina por serem aminoácidos auxotróficos cuja concentração em meio SC é bastante inferior à do meio CAA e do meio SC mínimo (contém a concentração necessária dos aminoácidos imprescindíveis para a estirpe BY4741 crescer sem restrições [28]); (ii) arginina, isoleucina e lisina por serem os aminoácidos essenciais (apesar de não-auxotróficos) cuja concentração é muito inferior relativamente ao meio CAA e ao previsto no meio SC teórico (calculado tendo em conta a composição em aminoácidos da *S. cerevisiae* e o rendimento em biomassa da estirpe BY4741). A histidina não foi considerada relevante pois a sua concentração no meio SC é cerca de 3 vezes superior à concentração prevista necessária para crescer as células tendo em conta o rendimento em biomassa desta estirpe.

O método mais sistemático para identificar o aminoácido responsável pelo primeiro máximo das curvas calorimétricas de *S. cerevisiae* em meio SC, consistiria em obter curvas calorimétricas de crescimento em diferentes meios SC extra-suplementados em cada aminoácido individualmente. Contudo este método seria extremamente demorado devido à elevada quantidade de aminoácidos a testar e portanto tentou-se restringir o número de aminoácidos candidatos. Existindo uma deficiência em determinado aminoácido no meio de cultura o metabolismo é afetado e consequentemente o crescimento celular deverá ser menor e menos células serão obtidas na fase estacionária.

Suplementando o meio SC com os aminoácidos em défice, de modo a igualar as concentrações em que estão presentes no meio CAA, é de esperar que o crescimento celular seja idêntico ao observado neste último meio. Na Figura 13, pode-se notar que apenas o meio Σ aa, que é o resultado da suplementação do meio SC com todos os aminoácidos selecionados (5x leucina, 10x arginina, 8x metionina, 10x isoleucina e 15x lisina), consegue reproduzir o crescimento observado em meio CAA. A curva calorimétrica de *S. cerevisiae* a crescer no meio Σ aa apresenta um único máximo (Figura S3), indicando que a deficiência em pelo menos um dos aminoácidos leucina, arginina, metionina, isoleucina ou lisina é responsável pelo primeiro máximo observado em meio SC. O facto de nenhum destes aminoácidos individualmente ter conseguido promover um crescimento em meio SC equivalente ao do meio CAA é indicativo de que se trata de um problema bi- ou multifactorial, originado pelo esgotamento aproximadamente simultâneo de 2 ou mais dos 5 aminoácidos considerados.

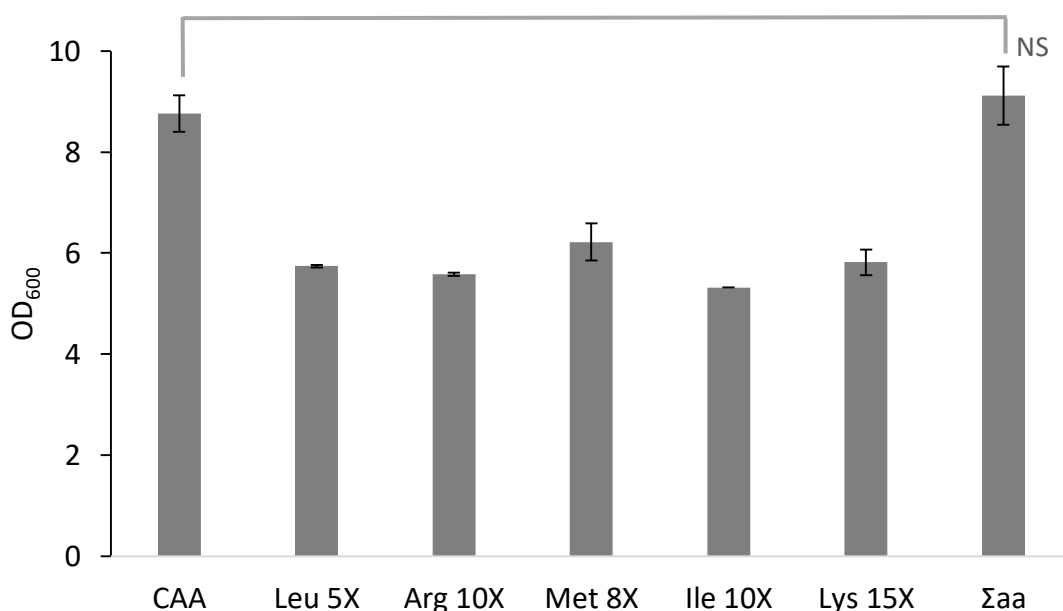


Figura 13 – Densidade celular (OD₆₀₀) da *S. cerevisiae* na fase estacionária de diversos meios SC extra suplementados. Os meios foram preparados adicionando um excesso do aminoácido indicado de modo a mimetizar a concentração no meio CAA. As barras de erro representam o desvio padrão. Todas as amostras foram feitas, no mínimo em duplicado ($n \geq 2$). NS, não significativo.

Em seguida, realizaram-se experiências em que a concentração de um dos aminoácidos no meio Σ aa foi ajustada ao valor utilizado no meio SC. Na Figura 14, pode-se constatar que retirar os suplementos de arginina (Arg -), isoleucina (Ile -) e lisina (Lys -) ao meio Σ aa não produz qualquer efeito, verificando-se um crescimento idêntico ao observado nos meios Σ aa e CAA. Porém a diminuição da concentração de metionina no meio Σ aa (Met -), para o nível presente no meio SC, afecta drasticamente a densidade celular atingida na fase, passando a ser praticamente igual à do meio SC. Apesar de o teor em metionina ser o factor que mais o crescimento celular, há também um efeito sensível quando se diminuiu a concentração de leucina no meio Σ aa.

Possivelmente, a metionina deverá ser o primeiro aminoácido a esgotar-se no meio SC e pouco depois deverá esgotar-se a leucina, daí que não se verifique uma grande diferença na densidade celular ao suplementar o meio SC apenas com metionina (Figura 13) pois logo asseguir acaba a leucina (outro nutriente auxotrófico). Estes dados justificariam a razão pela qual não se observou fase pós-díáuxica em meio SC, isto é, devido à falta de recursos para iniciar a fase pós-díáuxica.

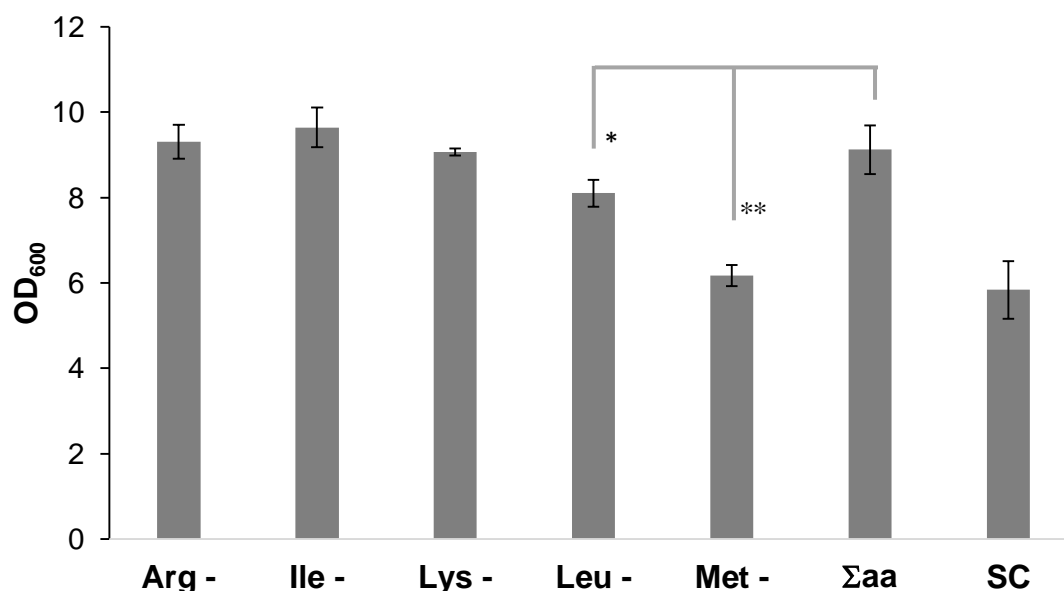


Figura 14 – A metionina e leucina são os principais aminoácidos limitantes do crescimento celular da *S. cerevisiae* em meio SC. A densidade celular (OD₆₀₀) da *S. cerevisiae* foi medida na fase estacionária (aproximadamente às 100h após inoculação). Os meios foram preparados com base no meio Σ aa retirando o excesso do aminoácido indicado de modo a mimetizar a concentração no meio SC. As barras de erro representam o desvio padrão. Todas as amostras foram feitas, no mínimo em triplicado ($n = 3$). *, p -value < 0.05; **, p -value < 0.01.

As deficiências em metionina e leucina no meio SC são responsáveis por uma diminuição da densidade celular obtida na fase estacionária. Assumindo que o primeiro máximo das curvas calorimétricas observadas em meio SC pode ser causado pela depleção de um aminoácido do meio, a metionina ou então a metionina + leucina, perfilam-se como os principais candidatos.

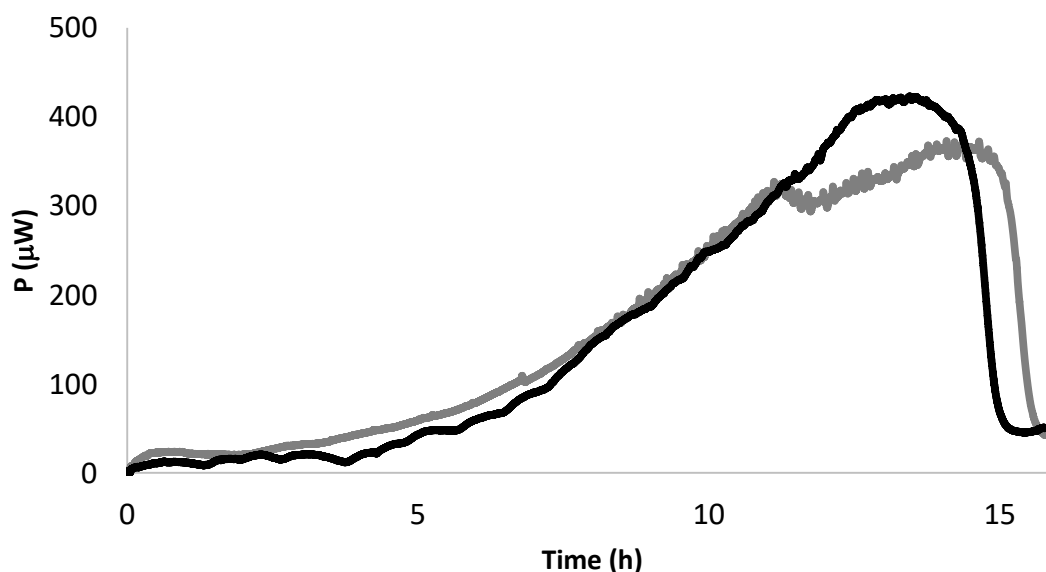


Figura 15 - Curva calorimétrica de *S. cerevisiae* BY4741 a crescer em meio SC (cinza) e em meio SC extra suplementado com 5X metionina (preto).

Na Figura 15, apresenta-se uma curva calorimétrica de *S. cerevisiae* BY4741 em meio SC suplementado com um excesso de 5x metionina. A potência máxima atingida é ligeiramente superior ($P\text{-value} = 0.0026$), $411 \pm 11 \mu\text{W}$ ($n = 3$), à atingida no meio SC *standard*, $365 \pm 17 \mu\text{W}$ ($n = 5$). Para além disso, o suplemento de metionina faz desaparecer o primeiro máximo que se observa nas curvas de crescimento de *S. cerevisiae* em meio SC, indicando que num meio SC típico a concentração de metionina é insuficiente para proporcionar uma fase exponencial sem qualquer limitação nutricional.

Este primeiro pico está portanto associado a uma carência nutricional de metionina, podendo reflectir um esgotamento completo deste aminoácido ou a diminuição da sua concentração abaixo de um limiar crítico apartir do qual o metabolismo é alterado. A segunda hipótese parece mais provável tendo em conta que a estirpe usada não tem capacidade de sintetizar metionina e as células não cessão a sua divisão após observação do primeiro máximo da curva calorimétrica em meio SC. Assim esta singularidade nas curvas calorimétricas de crescimento da *S. cerevisiae* BY4741 em meio SC reflectem possivelmente uma adaptação metabólica das células a baixas concentrações de metionina. Uma outra possibilidade é em face de um esgotamento de metionina, a célula entrar num estado de auto-proteólise em que degrada proteínas intracelulares menos importantes para obter a metionina necessária à síntese das proteínas requeridas para assegurar a manutenção do ciclo celular [22] [94]. Isso explicaria que a divisão celular não cessasse imediatamente após o esgotamento da metionina.

Em situações de fome associada a nutrientes naturais, isto é, quando o crescimento celular é limitado por nutrientes como amónia, fosfatos ou sulfatos; a restante glucose presente no meio não é consumida, devido à incapacidade das células produzirem biomassa, sendo portanto uma medida de poupança de recursos [22] [29]. Contudo quando o crescimento é limitado por um nutriente auxotrófico, criando uma situação de fome “artificial” ou não natural (nutrientes apenas tornados essenciais por mutação do

genoma), o excesso de glucose é totalmente consumido. Na Figura 10C, após as 10 h, pode-se observar que continua a haver consumo de glucose e para além disso a concentração de glucose decresce linearmente com o tempo. Isto é característico de situações de fome associada nutrientes “não naturais” [22] [28], para as quais a célula não possui qualquer mecanismo de poupança de recursos.

A fome de metionina é um caso algo particular de fome associada às auxotrofias, que se encontra entre as situações de fome natural e auxotrófica. De facto, observa-se uma sobrevivência maior e um consumo de glucose algo inferior às de outras auxotrofias, sendo o aumento de sobrevivência atribuído à indução das vias de resposta ao *stress* oxidativo e a um aumento da função mitocondrial não-respiratória [30].

A composição dos meios de cultura sintéticos usados para a cultura de *S. cerevisiae* é pouco variável relativamente à concentração de aminoácidos, tendo estes meios sido desenhados há décadas para o crescimento de leveduras prototróficas e não para as estirpe auxotróficas modernas [28] [95] [96]. Há portanto a necessidade de actualizar a composição destes meios de cultura para satisfazer as necessidades metabólicas das estirpes modernas, evitando a carência de algum nutriente, descrita nesta secção, que involuntariamente pode inviabilizar todo um projecto de investigação. Conforme demonstrado na presente Tese, a calorimetria é uma ferramenta particularmente interessante para o desenho e optimização de meios de cultura.

4.2.2. A quantidade de Inositol no meio SC é insuficiente para proporcionar um crescimento exponencial constante.

Apesar da deficiência em metionina estar na origem do primeiro máximo das curvas calorimétricas em meio SC, esta deficiência não é responsável pela mudança da taxa de crescimento que acontece ao fim de sensivelmente 9h. De facto, culturas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC extra suplementado com metionina ou em meio CAA apresentam uma mudança de declives semelhante durante a fase exponencial. Isto significa que a origem deste fenómeno não está associada a uma deficiência em aminoácidos, mas sim de um ou mais dos restantes componentes comuns a ambos os meios: uracilo, adenina e YNB.

A quantidade de adenina presente nos meios SC e CAA, é próxima da quantidade teórica necessária para proporcionar um crescimento exponencial com uma taxa de crescimento máxima e rendimento em biomassa constantes, Quadro 3. Para além disso não se trata de um nutriente auxotrófico. Por isso, a influência da concentração de adenina nas curvas de crescimento não foi analisada.

Na Figura 16, é possível observar o crescimento celular ao longo do tempo em meio SC quando extra suplementado com aminoácidos auxotróficos e uracilo, YNB ou inositol.

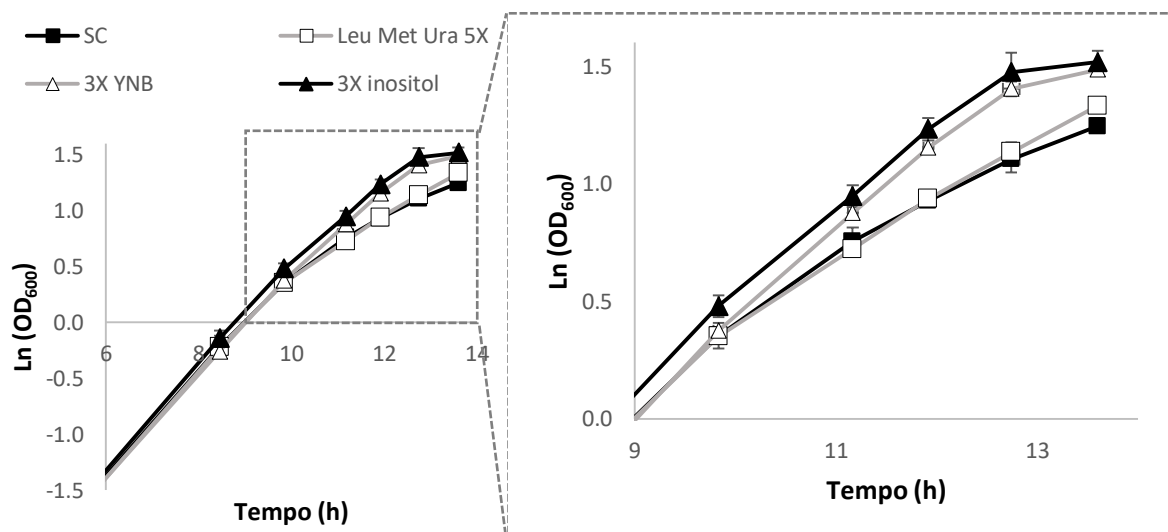


Figura 16 – Suplementação extra do meio SC com YNB ou inositol garante um crescimento exponencial constante. Foi acompanhada a densidade celular (OD_{600}) de culturas de *S. cerevisiae* BY4741 em meio SC (■), meio SC extra-suplementado para as auxotrofias desta estirpe (leucina, metionina e uracilo) (□), YNB (△) ou inositol (▲).

A suplementação “extra” das auxotrofias do meio SC com um excesso de 5x de leucina, metionina e uracilo (relativamente à concentração no meio SC normal) conduz ao mesmo comportamento observado em meio SC normal (controlo). Isto permite excluir a falta de uracilo como responsável pela diminuição da taxa de crescimento.

A taxa de crescimento da *S. cerevisiae* num meio SC contendo o triplo da quantidade *standard* de YNB, mantém-se mais constante até ao fim da fase exponencial. De acordo com estes resultados, a

diminuição da taxa de crescimento está associada ao défice de YNB, sugerindo que um ou vários dos seus constituintes possam estar presentes em quantidades insuficientes na mistura YNB. O YNB é usado como integrante dos meios sintéticos servindo como fonte de azoto, fósforo e enxofre, assim como de vitaminas, alguns elementos vestigiais, sais e fatores de crescimento essenciais para o crescimento celular. A assimilação destes nutrientes do meio alivia a carga biosintética das células, permitindo-lhes poupar energia e recursos, possibilitando um crescimento exponencial ótimo a uma taxa de crescimento máxima [95].

De entre os fatores de crescimento presentes no YNB com influência direta na eficiência da divisão celular, destaca-se o inositol. A sua ausência no meio faz diminuir a eficiência da divisão celular e provoca alterações a nível da morfologia da parede celular [95]. De facto as culturas de *S. cerevisiae* crescidas em meio SC extra suplementadas com o triplo da quantidade de inositol apresentam uma taxa de crescimento constante após as 9h, à semelhança das culturas extra-suplementadas com YNB (Figura 16). O inositol é portanto o componente do YNB cuja depleção é responsável pela diminuição da taxa de crescimento durante a fase exponencial da *S. cerevisiae*.

Estes dados estão de acordo com a literatura [97] [98] onde se observou que culturas de *S. cerevisiae* na ausência de inositol apresentavam uma diminuição na taxa de crescimento relativamente a culturas (bem) suplementadas com inositol. Também na referência [28] foi documentada a falta de inositol presente no YNB, incapaz de proporcionar um crescimento exponencial de *S. cerevisiae* com uma taxa de crescimento máxima e constante. A diminuição do inositol no meio de cultura provoca a de-repressão do gene *INO1*, que codifica para o 3P-inositol sintase, aumentando assim a expressão do enzima limitante da via biosintética do inositol e consequentemente a síntese de inositol [99]. Apesar da *S. cerevisiae* conseguir sintetizar inositol, quando o inositol presente no meio se esgota ocorre uma diminuição da taxa de crescimento como se observou neste trabalho, sugerindo que a síntese endógena de inositol não ocorre com rapidez suficiente para que as células cresçam à taxa máxima.

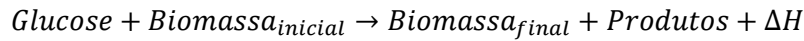
A ligeira diminuição da taxa de crescimento ao longo do tempo, que se observa nas culturas de *S. cerevisiae* extra suplementadas com YNB ou inositol, é previsível pois ao longo do tempo a taxa de crescimento tende a diminuir ligeiramente [22] antes da mudança diáuxica. Este fenómeno deverá ser resultado de uma acumulação cada vez maior de células *S. cerevisiae* com um crescimento mais lento (*slow-growing*) que aumentam em termos relativos na população geral e que são caracterizados por terem tempos de duplicação muito mais longos, fazendo baixar a taxa de crescimento da população [100].

Face aos resultados obtidos nesta secção, pode-se afirmar que a quantidade de inositol presente no YNB (e no meio SC) não é suficiente para proporcionar um crescimento exponencial da estirpe BY4741 a uma taxa máxima e constante. Sendo a quantidade de YNB recomendada e usada em todos os meios de cultura sintéticos semelhante, este problema torna-se praticamente universal com possíveis

implicações em resultados obtidos nas fases exponenciais tardias ou estacionária onde diversos fenómenos induzidos pela depleção do inositol podem ter ocorrido: alterações nas vias de sinalização dependentes de inositol (que é uma molécula de sinalização em diversas vias, assim como um precursor de diversas outras moléculas de sinalização); alterações na constituição das membranas; alterações a nível da sobrevivência; um aumento do volume celular; e claro a diminuição da taxa de crescimento [28] [99]. Uma vez mais tornam-se evidentes as claras fragilidades do meio SC em proporcionar um crescimento exponencial constante caracterizado por constantes alterações e perturbações ao nível do metabolismo.

4.3. Balanços energéticos

O crescimento microbiológico é um processo complexo, durante o qual há libertação de calor que é resultado das reações que ocorrem no interior da célula. Estas reações podem fazer parte da via anabólica, levando à formação de biomassa, ou das vias catabólicas para obtenção de energia com formação de produtos. Deste modo pode-se resumir o crescimento microbiológico baseado na glucose como:



O facto do calor libertado neste processo ser inespecífico acaba por ser uma desvantagem. No entanto, quando a sua determinação é aliada a medidas auxiliares (ex.: biomassa, consumo de glucose, formação de um dado produto), pode fornecer informação quantitativa sobre as variações energéticas associadas a uma dada variável que é específica de cada organismo, do tipo de metabolismo e das condições de cultura [32].

Para efetuar os balanços relativos à eficiência energética da estirpe estudada quando sujeita às condições de fome anteriormente referidas foi necessário converter a densidade celular, OD_{600} , em biomassa. Verificou-se que as duas grandezas estavam relacionadas linearmente, Figura 17, ao longo de todo o crescimento exponencial com um declive de $0.579 \pm 0.077 \text{ g.L}^{-1} \text{ Biomassa } OD_{600}^{-1}$ ($n = 4$). Este valor é próximo de outro anteriormente publicado para a mesma estirpe, $0.408 \text{ g.L}^{-1} \text{ Biomassa } OD_{590}^{-1}$ [101], que se refere, no entanto, a 590 nm.

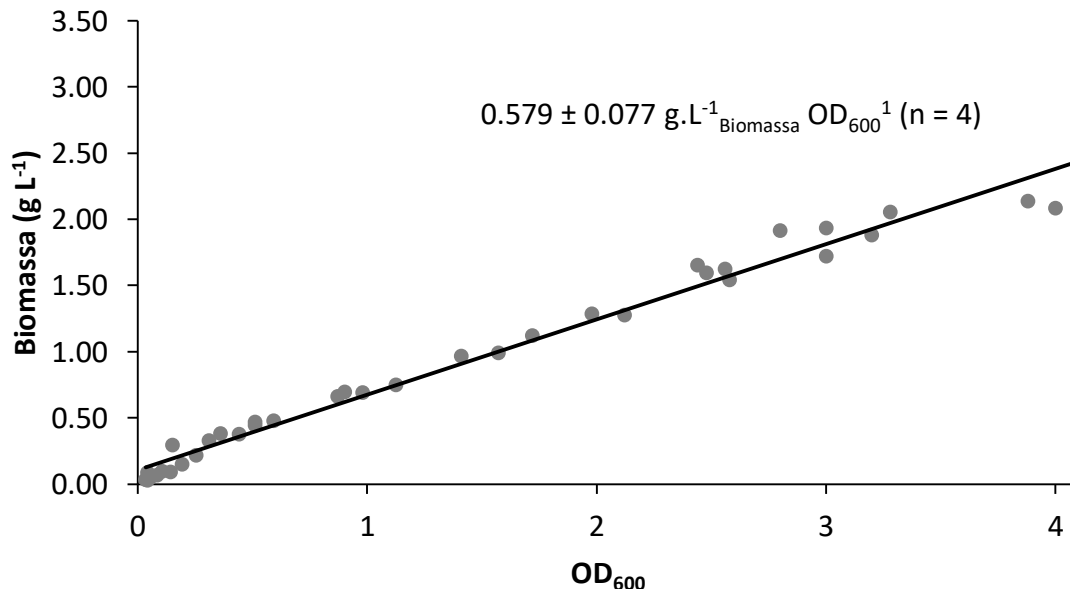


Figura 17 – Reta de calibração da biomassa de culturas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC (usando glucose como fonte de carbono) em função do OD_{600} . Encontram-se representadas 4 experiências independentes.

Tal como já anteriormente discutido, o meio SC é um meio pobre, que não tem capacidade para proporcionar um crescimento exponencial sem limitações nutricionais associadas à metionina e ao

inótol. Encontra-se descrito na literatura que quer numa situação de “fome natural” ou “não-natural” a produção de biomassa e o consumo de glucose são afetados [22] [28].

De forma a averiguar se as limitações nutricionais encontradas no meio SC influenciam a capacidade biosintética da estirpe estudada, determinou-se o rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), que é definido como a quantidade de biomassa sintetizada por mole de substrato consumido, associado à fase respiro-fermentativa. O rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) é um parâmetro extremamente importante uma vez que representa a fração de substrato que é encaminhada para o metabolismo anabólico, permitindo determinar assim a quantidade de substrato encaminhada para o catabolismo. A partir da correlação entre biomassa e OD_{600} (Figura 17) foi determinado o rendimento em biomassa, representando-se a biomassa cumulativa (X) das culturas crescidas em meio SC em função da glucose consumida (S), Figura 18, tal como descrito em [36]:

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S} = \frac{\frac{\text{biomassa } g.L^{-1}}{24.4 \text{ g.Cmol}^{-1}_{\text{biomassa}}}}{\text{glucose mol.L}^{-1} \times 6 \text{ Cmol.mol}^{-1}_{\text{glucose}}} \quad (13)$$

A biomassa e a glucose foram transformadas em C-mol por simplificar os balanços entálpicos bastando assim seguir o carbono, que acaba por ser o elemento mais abundante da biomassa, sendo a frequência dos outros elementos dada em função do carbono. Uma vez que a composição elementar da estirpe BY4741 da *S. cerevisiae* não é conhecida, admitiu-se que correspondia a $CH_{1.71}O_{0.52}N_{0.17}$ possuindo uma massa molar igual a de $24.4 \text{ g C-mol}^{-1}$ [36]. Esta massa molar é representativa de várias espécies de *S. cerevisiae* [36], e não difere significativamente de valores característicos de espécies distintas como é o caso da *kluveromyces fragilis* ($24.14 \text{ g C-mol}^{-1}$) [89].

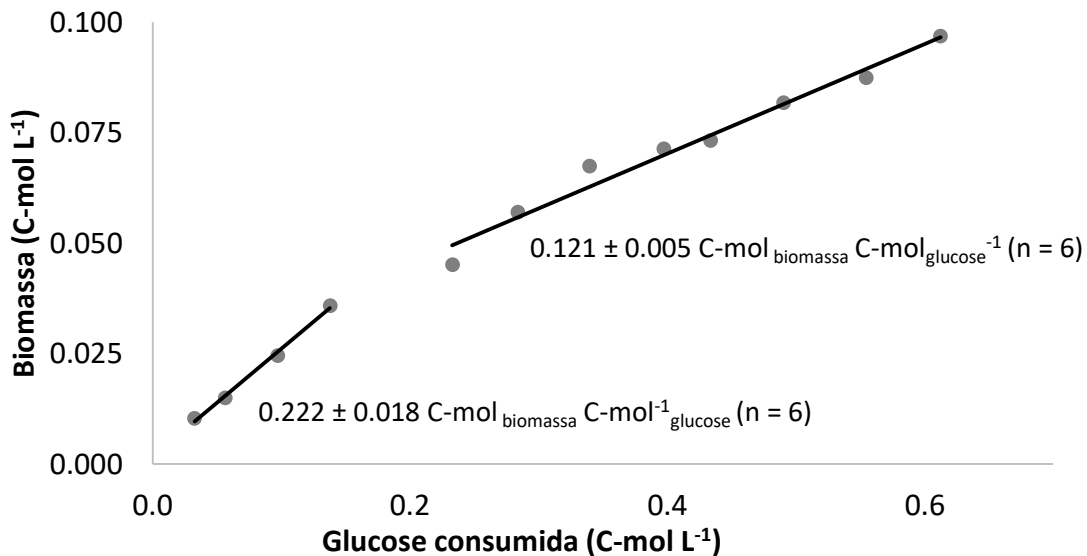


Figura 18 - Determinação do rendimento em biomassa de culturas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC.

Como se pode observar na Figura 18, o rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) das culturas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC apresentam dois regimes distintos: um regime inicial caracterizado por um declive de $0.222 \pm 0.018 \text{ C-mol}_{\text{biomassa}} \text{ C-mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ($n = 6$) que dura até cerca das $10.3 \pm 0.5 \text{ h}$ ($n = 5$); e um segundo regime em que o declive decresce para $0.121 \pm 0.005 \text{ C-mol}_{\text{biomassa}} \text{ C-mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ($n = 6$), valor este que é mais próximo de outros valores publicados na literatura para esta estirpe, $0.156 \text{ C-mol}_{\text{biomassa}} \text{ C-mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ [101], ou $0.130 \pm 0.003 \text{ C-mol}_{\text{biomassa}} \text{ C-mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ para outra estirpe [36], em meios SC e sintético mínimo (apenas YNB e glucose), respetivamente.

O facto de o rendimento em biomassa ter um perfil bifásico pode ser compatível com os problemas de fome associados ao meio SC que podem reduzir a eficiência metabólica, levando ao desperdício de glucose, e diminuindo, consequentemente, o rendimento em biomassa numa fase mais tardia [15] [22]. De facto, a mudança de declives no rendimento em biomassa ocorre por volta das 10.3 h, entre a mudança de taxa de crescimento causada pelo inositol e a situação de fome associada à metionina, pelo que pode ser um destes fatores a causa dessa alteração. Uma explicação alternativa, é que o primeiro declive seja maior devido a uma maior componente de metabolismo oxidativo, caracterizado por um rendimento em biomassa bastante superior ao da fase respiro-fermentativa [27] [36] [102]. Esta hipótese é apoiada pelas seguintes observações: (i) diminuição da respiração por célula ao longo da fase exponencial descrita na literatura [12] e discutida na secção 4.1, Figura 10C; (ii) diminuição da potência específica por célula, Figura 10B; (iii) consumo praticamente nulo de glucose durante as primeiras 6-8 h, o que é, consistente com um maior aproveitamento energético da respiração.

A eficiência com que as células incorporam o substrato é, aparentemente, superior durante o início da exponencial, como se pode constatar pelo maior declive inicial na Figura 18. O mesmo acontece com a entalpia associada ao metabolismo da glucose, $\Delta_r H$, Figura 19. Em condições *batch* o $\Delta_r H$ (declive) aparenta ser superior até aos 20 – 40 mM glucose, Figura 19, e só numa segunda fase parece tornar-se constante, com um valor médio altamente reprodutível de $134.5 \pm 3.2 \text{ kJ.mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ($n = 5$). Esta observação de uma entalpia variável ao longo da fase exponencial, sobretudo no início onde a contribuição da respiração é mais significativa, é consistente com a diminuição da respiração ao longo da fase exponencial.

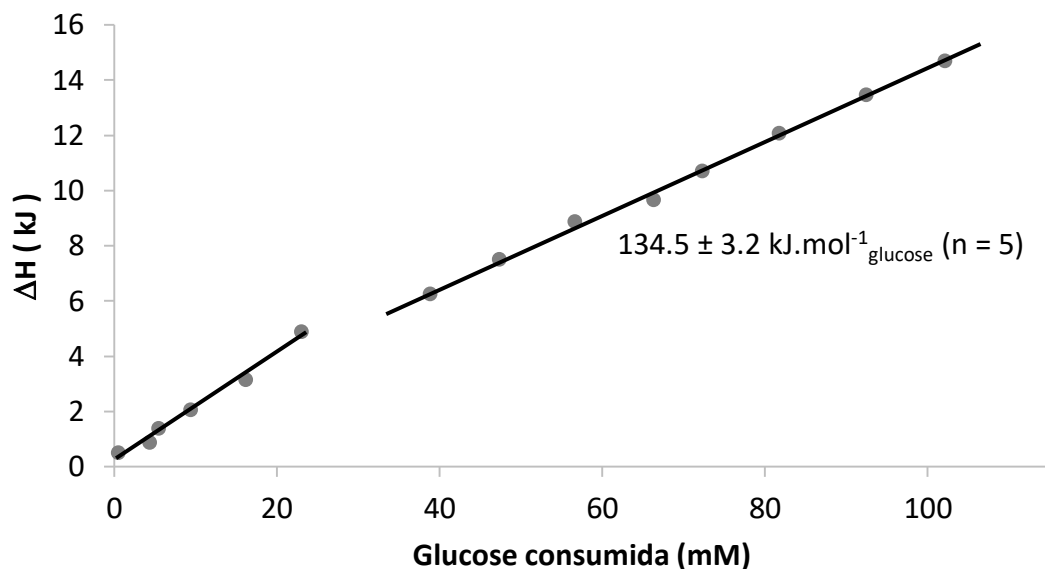


Figura 19 – Entalpia associada ao metabolismo respiro-fermentativo da glucose pela *S. cerevisiae* a crescer em meio SC.

Uma possível justificação para a estabilização da entalpia, prende-se com o facto da respiração por célula tornar-se praticamente constante a partir das 6 - 7 h, sendo a contribuição do metabolismo oxidativo menos significativa face ao metabolismo fermentativo e praticamente constante. Se assumirmos que todo o O_2 é consumido na respiração celular, então a quantidade de O_2 consumido é proporcional ao calor no metabolismo respiratório da glucose:

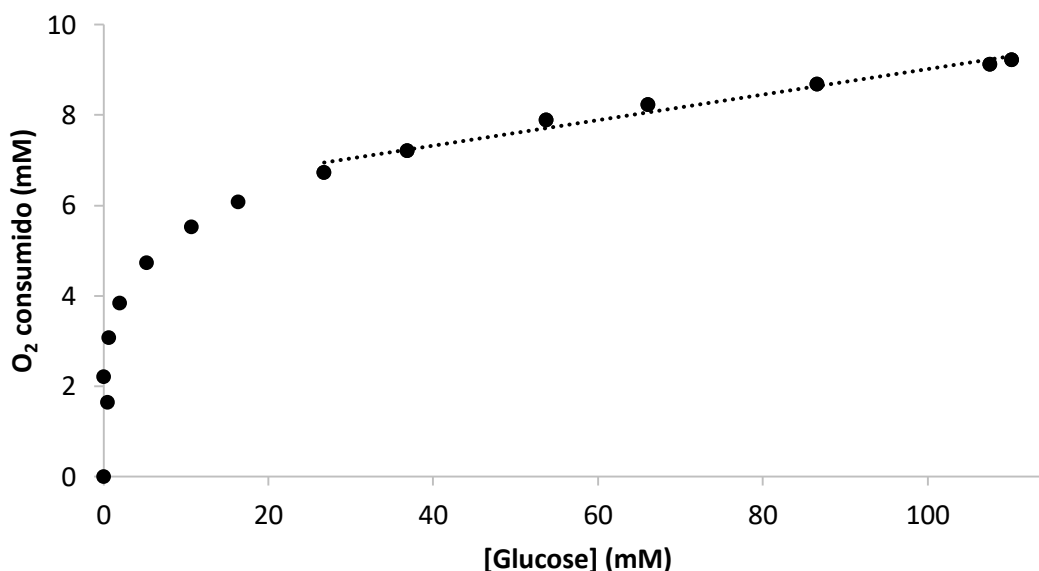
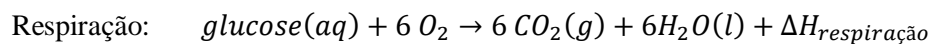


Figura 20 – Perfil de O_2 consumido em função da glucose consumida torna-se aproximadamente linear a partir dos 20 – 40 mM glucose.

A relação observada entre o O₂ consumido e a glucose consumida, Figura 20, parece justificar a hipótese de que inicialmente a entalpia de metabolização da glucose é superior devido à componente respiratória que liberta uma quantidade de calor considerável resultando numa entalpia não definida e elevada. Contudo o metabolismo respiratório a partir de certa altura (20 a 40 mM glucose) passa a contribuir com um valor aproximadamente constante e baixo.

Se se descontar a entalpia associada ao metabolismo respiratório, a Figura 19 passa a ser linear desde o início como se pode observar na Figura S4, reforçando a hipótese anterior.

Assumindo o valor obtido para o rendimento em biomassa e a entalpia associada à metabolização da glucose, é possível determinar qual a contribuição dos dois tipos de metabolismo, oxidativo e fermentativo, que ocorrem durante a maior parte da fase exponencial. De forma a calcular estes parâmetros, torna-se necessário saber qual a fração de glucose dispensada para o anabolismo e catabolismo, sendo que praticamente todo o calor é originado na via catabólica.

O grau de redução (γ) representa o número de electrões por unidade de carbono no substrato ou biomassa. Este coeficiente pode ser usado para estabelecer balanços de electrões disponíveis entre o substrato e a biomassa, sendo que os electrões são conservados nas reações químicas. Através do rendimento em biomassa consegue-se determinar qual a fração de glucose que é consumida nos processos anabólicos ($x_{anabolismo}$), tal como descrito em [36]:

$$e_{substrato\ que\ origina\ biomassa}^- = e_{biomassa}^- \Leftrightarrow \quad (14)$$

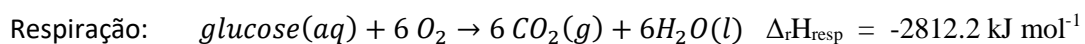
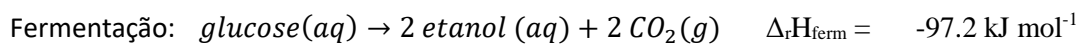
$$\Leftrightarrow [S]_{anabolismo} \times \gamma_S = [X] \times \gamma_X \Leftrightarrow \quad (15)$$

$$\Leftrightarrow x_{anabolismo} \times \gamma_S = Y_{X/S} \times \gamma_X \Leftrightarrow \quad (16)$$

$$\Leftrightarrow x_{anabolismo} = Y_{X/S} \times \frac{\gamma_X}{\gamma_S} \quad (17)$$

Onde γ_X representa o grau de redução da biomassa, 4.16, e γ_S é o grau de redução da glucose, 4 [36]. O anabolismo representa cerca de 23.1% e 12.6% de todo o metabolismo da glucose assumindo os ganhos em biomassa anteriormente obtidos (Figura 18) para a primeira e segunda fases do crescimento exponencial, respetivamente. Sendo o metabolismo composto por anabolismo e catabolismo, podemos portanto assumir que a restante glucose é consumida nas vias catabólicas, nomeadamente a glicólise, com concomitante libertação de calor que é registado pelo calorímetro.

As entalpias associadas ao metabolismo da glucose por via puramente fermentativa e por metabolismo oxidativo são [36]:



Estes valores de entalpia foram calculados a partir das entalpias de formação dos reagentes e produtos. As equações não entram em conta com o ADP/ATP formados pois o ATP obtido é hidrolisado em reações anabólicas para as tornar termodinamicamente favoráveis e portanto a sua concentração nas células é estacionária, o que equivale a assumir que não há fosforilação de ADP a ATP nas equações.

Todos os processos metabólicos que ocorrem nas células, o que inclui anabolismo e catabolismo, contribuem para o calor medido, no entanto a contribuição do anabolismo é desprezável face ao catabolismo, sendo o calor registado calorimetricamente resultante quase exclusivamente da fração de glucose desviada para o catabolismo, $x_{catabolismo}$ [36] [103].

$$Q \approx Q_{catabolismo} = \frac{Q}{\Delta_{glucose} \times x_{catabolismo}} = \frac{\frac{Q}{\Delta_{glucose}}}{x_{catabolismo}} = \frac{\Delta_r H}{x_{catabolismo}} \quad (18)$$

Onde, $\Delta_{glucose}$ é o consumo de substrato. Assumindo que num metabolismo misto do tipo respiro-fermentativo, essa glucose é dividida pelas vias fermentativa e respiratória:

$$\frac{\Delta_r H}{x_{catabolismo}} = \Delta H_{ferm} + \Delta H_{resp} \Leftrightarrow \quad (19)$$

$$\Leftrightarrow \frac{\Delta_r H}{x_{catabolismo}} = x_{ferm} \times \Delta_r H_{ferm} + x_{resp} \times \Delta_r H_{resp} \quad (20)$$

Rearranjando a equação (20) assumindo que a fração de metabolismo respiratório, x_{resp} , é equivalente a $1-x_{ferm}$ (metabolismo fermentativo), tem-se:

$$x_{ferm} = \frac{\frac{\Delta_r H}{x_{catabolismo}} - \Delta_r H_{resp}}{\Delta_r H_{ferm} - \Delta_r H_{resp}} \quad (21)$$

Substituindo na equação (21) a entalpia de utilização da glucose ($\Delta_r H$) por $134.5 \pm 3.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ($n = 5$), o $x_{catabolismo}$ por 0.874 e considerando a entalpia de fermentação (ΔH_{ferm}) e respiração (ΔH_{resp}) da glucose iguais a 97.2 kJ mol^{-1} e $2812.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, respetivamente, chega-se à conclusão que cerca de 2.1% da glucose usada no catabolismo foi metabolizada por via respiratória. Deste modo os restantes 97.9% foram metabolizados por via fermentativa, assumindo o rendimento em biomassa de $0.121 \text{ C-mol}_{\text{biomassa}} \text{ C-mol}_{\text{glucose}}^{-1}$, da exponencial tardia. Não se determinou o valor para o início da exponencial pois a entalpia não apresenta um valor único reprodutível e portanto este cálculo apresenta um erro associado grande.

A *S. cerevisiae* é *Crabtree* positiva, isto é, o seu metabolismo respiratório e fosforilação oxidativa são inibidos pela glucose, numa resposta adaptativa rápida que redireciona o fluxo metabólico para a fermentação [11]. Apesar de ser *Crabtree* positiva, a *S. cerevisiae* mantém um mínimo de cerca de 2.1% de metabolismo respiratório na sua fase exponencial mais tardia e o restante é fermentação. Aparentemente a respiração diminui ao longo do início da fase exponencial, até atingir um valor mínimo

crítico (aproximadamente entre os 20 e 40 mM glucose) no qual a contribuição do metabolismo respiratório passa a ser aproximadamente constante (Figura 19), estabilizando a entalpia e justificando a linearidade observada na entalpia de utilização da glucose.

O calor libertado durante uma cultura de *S. cerevisiae* ao longo do tempo (Figura S5) tem uma cinética semelhante ao aumento da biomassa ao longo do crescimento, podendo constituir uma alternativa para a monitorização de diversos parâmetros como a produção de etanol, ou a formação de biomassa, ou consumo de glucose, desde que sejam determinados os coeficientes de proporcionalidade ao longo da fase de crescimento para estes parâmetros [89]. Destes parâmetros, o mais importante é o que correlaciona o calor libertado com a biomassa formada, o ganho térmico (Y_{QX}), uma vez que pode indicar que tipo de metabolismo está ativo [36], para além de permitir a determinação da biomassa indiretamente e em tempo real a partir do calor acumulado.

Os ganhos térmicos são normalmente determinados através de uma representação do calor cumulativo em função da biomassa cumulativa, Figura 21, o que normalmente resulta em correlações lineares perfeitas, sendo o declive igual a Y_{QX} .

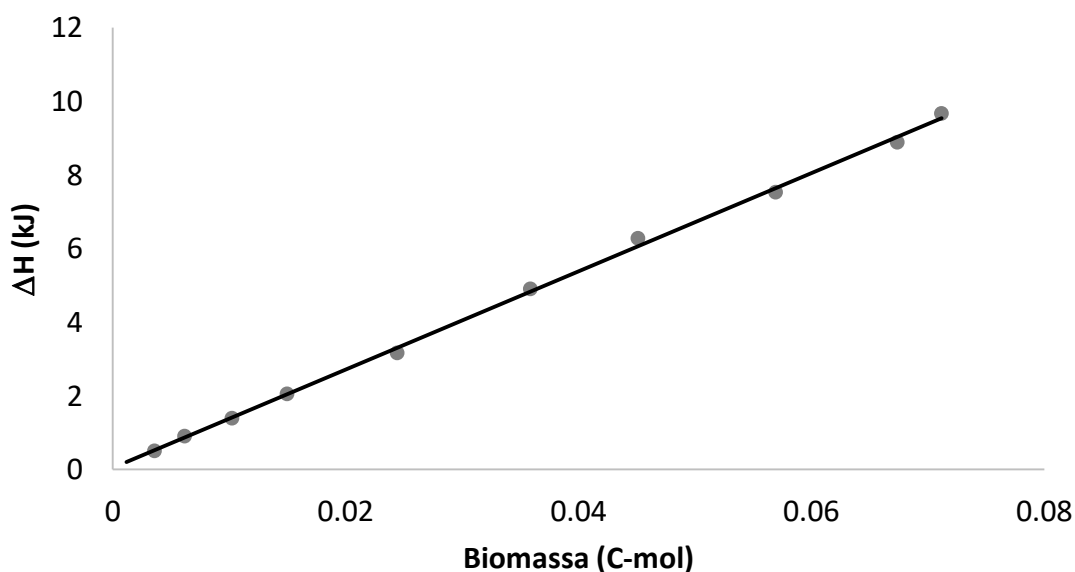


Figura 21 - Ganho térmico de uma cultura batch de *S. cerevisiae* em meio SC.

Apesar da dinâmica metabólica contínua ao longo da fase exponencial, o Y_{QX} é constante, com um valor de $147.6 \pm 9.9 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ ($n = 6$), indicando que o calor desperdiçado por unidade de biomassa é sempre o mesmo apesar do metabolismo ser progressivamente mais fermentativo com a diminuição da respiração (Figura 10C). Isto sugere que o aumento da fermentação em relação à respiração ao longo do crescimento respiro-fermentativo acaba por gerar uma fase de crescimento exponencial, caracterizado por uma taxa de crescimento constante, com uma taxa de libertação de calor por unidade de biomassa formada (ou célula) constante, Y_{QX} constante, sendo possível que seja esse

aumento da fermentação em relação à respiração que permite às células obter a energia necessária para assegurar uma rápida divisão celular e manter a taxa de crescimento constante.

O valor de Y_{QX} obtido é mais elevado do que o valor descrito de $89.0 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ para o crescimento exponencial de *S. cerevisiae* em completa anaerobiose [104], tal como esperado devido à componente oxidativa que possui um valor superior, descrito na literatura entre $244 - 366 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ para o crescimento em hexoses [87] [102]. Tanto quanto se sabe, este é o primeiro valor documentado de ganho térmico associado ao crescimento em modo *batch* de uma estirpe auxotrófica (BY4741) de *S. cerevisiae* em meio sintético com glucose. O valor determinado é próximo do valor $103.66 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ obtido para a fase respiro-fermentativa de uma cultura *batch* de *S. cerevisiae* (estirpe X4003-5B) a crescer em YPD [105]. Já foram reportados valores de $271.1 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ e $118.6 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$ relativamente aos ganhos térmicos de metabolismo aeróbio e metabolismo anaeróbio respetivamente, para outra levedura *k. fragilis*, usando glucose como substrato [89]. O valor determinado na Figura 21 encontra-se próximo do valor $118.6 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$, atribuído ao metabolismo anaeróbio, como seria de esperar dado o metabolismo ser preferencialmente fermentativo durante a fase exponencial.

Na literatura [36] encontra-se um valor de Y_{QX} igual a $250.8 \text{ kJ C-mol}^{-1}_{\text{biomassa}}$, também para culturas *batch* de *S. cerevisiae* (estirpe Y41) a crescer em glucose e em meio sintético definido (composto por YNB e glucose, sem suplementação com aminoácidos). Contudo, este valor parece anormalmente elevado, uma vez que coincide com o previsto para um metabolismo respiratório e, nesta cultura, o metabolismo é predominantemente fermentativo. A discrepância pode estar relacionada com um erro na determinação do volume efetivo, uma vez que o valor utilizado $V_{\text{eff}} = 0.331 \text{ mL}$ é inferior ao descrito noutras publicações para o mesmo calorímetro, variando entre 0.6 mL [106], 0.678 mL [107] e 0.7 mL [102, p. 368].

4.4. Hormese do H_2O_2

Durante várias décadas, o H_2O_2 foi visto como um produto secundário tóxico e inevitável do metabolismo oxidativo. No entanto a visão mais recente, não vê os ROS apenas como potenciais moléculas nocivas, mas sim como moléculas que em concentrações subletais podem atuar como segundos mensageiros na sinalização intracelular de diversos processos fisiológicos [42] [54] [64] [69].

Em leveduras, o H_2O_2 em doses baixas produz um efeito de hormese (efeito adaptativo a uma concentração baixa de um composto, que em concentrações mais elevadas tem um efeito contrário) caracterizado por um aumento de viabilidade em placa e um aumento da resistência (adaptação) à exposição subsequente a um *stress* maior [64] [66] [67]. Existem ainda diversas publicações que associam a produção endógena de H_2O_2 a um aumento da longevidade em leveduras [68].

Dada a importância do H_2O_2 na sinalização celular, investigou-se também se existe um efeito de hormese associado a baixas concentrações de H_2O_2 ao nível do metabolismo celular da estirpe BY4741. Para tal, foram adicionadas concentrações diferentes de H_2O_2 a culturas de *S. cerevisiae* em fase exponencial no calorímetro de fluxo. As adições foram efetuadas sempre à mesma densidade celular ($0.25\text{ OD}_{600\text{mL}^{-1}}$) visto que a resistência ao *stress* oxidativo desta levedura varia ao longo da fase exponencial [12]. Pretendia-se, para além disso, que a quantidade de H_2O_2 por célula fosse constante para iguais concentrações garantindo um máximo de reprodutibilidade nas mesmas condições, reduzindo, assim, as variáveis de confundimento.

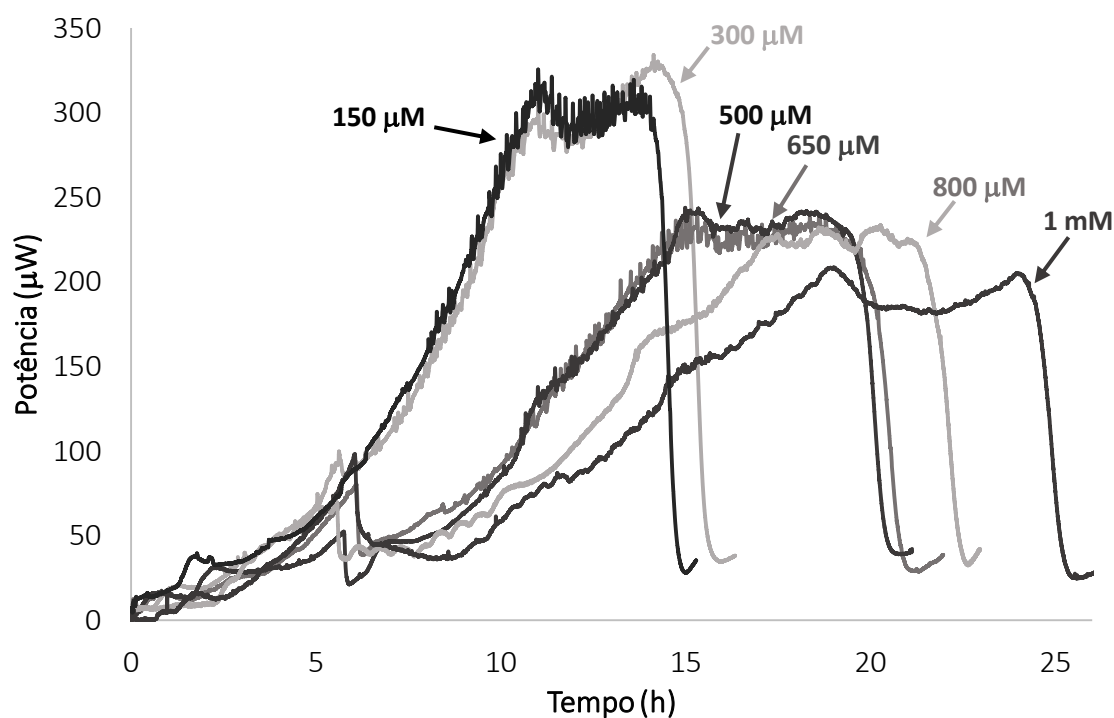


Figura 22 - Efeito de diferentes concentrações de H_2O_2 nas curvas calorimétricas de *S. cerevisiae* em meio SC. A adição de H_2O_2 ocorreu sempre aproximadamente às 6h (0.25 OD_{600}). A concentração de H_2O_2 usado para produzir cada curva encontra-se indicada na própria curva.

Na Figura 22 encontram-se curvas calorimétricas correspondentes a adições de H₂O₂ em diferentes concentrações. É possível constatar que consoante se aumenta a concentração de H₂O₂, aumenta o tempo de chegada à fase estacionária e simultaneamente ocorre uma diminuição na potência máxima atingida. Esta variação apenas não se verifica para as adições de 150 e 300 µM, cujo perfil calorimétrico é praticamente igual ao do controlo (Figura 10A).

Observa-se uma correlação entre a derivada do logaritmo da potência dissipada após a adição de H₂O₂ em função da concentração aplicada, Figura 23. O aumento da dose de H₂O₂, é acompanhado por diminuição do declive do logaritmo da potência dissipada pela população. Isto indica que a taxa de produção de calor por unidade de tempo é inferior em células expostas a H₂O₂ de um modo dependente da concentração.

Contudo, apesar deste “arrastamento” e “achatamento” das curvas para concentrações letais de H₂O₂, não houve alteração da entalpia associada ao crescimento celular, sugerindo que o gasto energético associado ao *stress* oxidativo não é muito elevado. Assumindo uma resposta antioxidante ao nível do catalase não há grande dispêndio energético pois este enzima não tem necessidade de cofatores ou *input* de energia para a sua reação. Numa resposta dependente de GPx, ocorre a oxidação do enzima na degradação do H₂O₂ sendo regenerado em última análise à custa do consumo de NADPH via o *shunt* de GPx/GSH/NADPH. O NADPH é facilmente obtido na via dos fosfatos de pentose sem grande desperdício de glucose pois os metabolitos finais desta via podem ser integrados novamente no fluxo glicolítico e usados como fonte de energia. A resposta antioxidante do CCP é dependente da oxidação do enzima, seguido de regeneração à custa de equivalentes redutores produzidos na cadeia transportadora de eletrões.

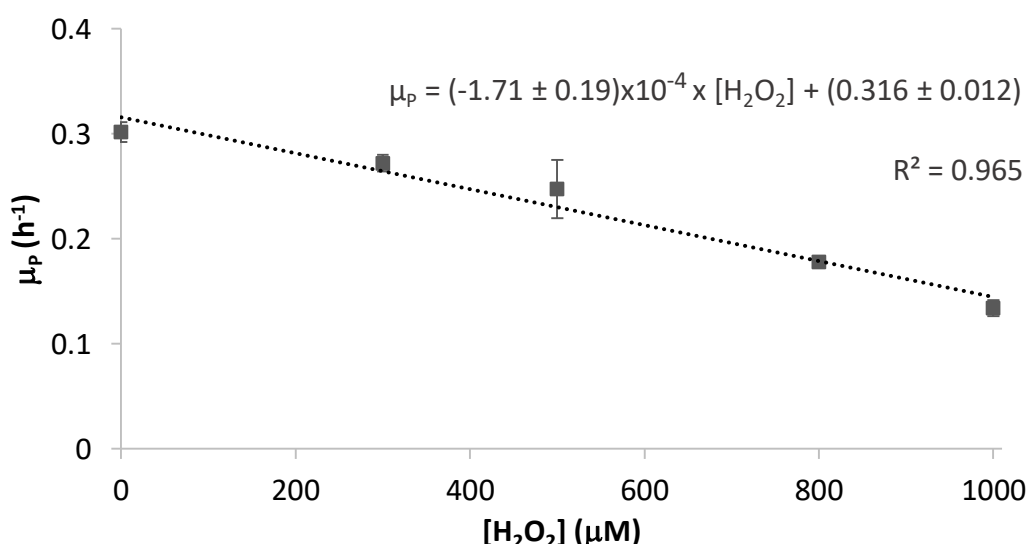


Figura 23 - O declive do logaritmo da potência dissipada (μ_P) ao longo do tempo por uma cultura de *S. cerevisiae* tende a diminuir com o aumento da concentração de H₂O₂ adicionado. A derivada do logaritmo da potência foi determinada no intervalo entre o momento da adição de H₂O₂, até ao primeiro máximo da curva calorimétrica. As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos 2 experiências independentes ($n \geq 2$).

Assumindo uma entalpia de $-100.4 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a reação do catalase [108], de $-350.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a reação do CCP [83] e $-348.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ para as reações do GPx [109] e da peroxidase, a resposta antioxidante para 1mM de H_2O_2 (concentração máxima usada) resultaria num aumento de 0.100 kJ dm^{-3} , 0.351 kJ dm^{-3} e 0.348 kJ dm^{-3} , respetivamente. Tendo em conta a entalpia associada ao crescimento da *S. cerevisiae* até à fase estacionária de $16.83 \pm 0.42 \text{ kJ dm}^{-3}$ (n=4), a resposta antioxidante pode representar um aumento de 0.6% a 2.1%, o que está dentro do erro do valor determinado.

Na Figura 24 é ampliada a zona do gráfico correspondente à adição de H_2O_2 , para ter uma melhor percepção do efeito imediato desta adição. Pode-se observar que uma dose letal de H_2O_2 provoca uma diminuição da potência dissipada pela população, sendo essa diminuição devida à morte celular ou então devido à diminuição do metabolismo, caso o número de células persista. Contrariamente, a concentração de $150 \mu\text{M}$ produziu um aumento da potência dissipada pela população, indiciando um efeito de hormese, que poderá estar associado a um aumento do metabolismo ou da resposta antioxidante imediata, acompanhada por uma libertação de calor.

O aumento da potência após doses adaptativas de H_2O_2 é imediato, o que temporalmente exclui a hipótese de se tratar de um mecanismo adaptativo associado à tradução ou transcrição dos sistemas de resposta ao *stress* por ser muito rápido. A causa mais provável para este aumento de potência dissipada deverá ser o consumo de H_2O_2 pelos enzimas antioxidantes. Independentemente do enzima responsável por essa destoxificação, o processo tem sempre uma entalpia negativa associada, tal como o crescimento celular (as curvas são apresentadas segundo o eixo positivo por conveniência), contribuindo para o aumento na potência dissipada.

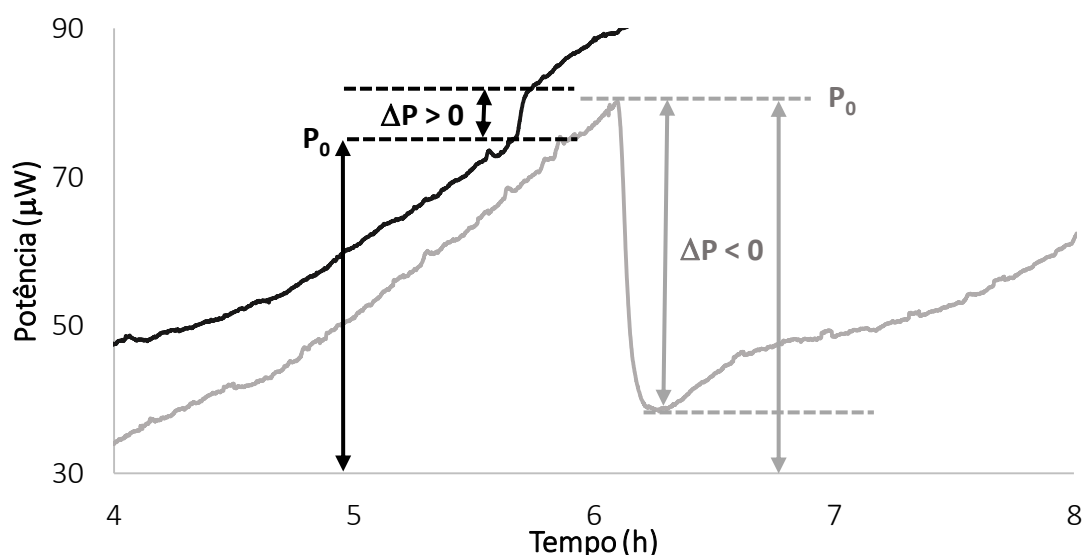


Figura 24 – A potência dissipada por culturas de *S. cerevisiae* aumenta na exposição a uma dose subletal de H_2O_2 e diminui na exposição a doses letais. A preto encontra-se a potência dissipada da cultura exposta a $150 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (dose subletal) e a cinza a cultura exposta a $500 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (dose letal).

Normalizando a variação na potência produzida pela adição de H_2O_2 (μP) em função da potência da população imediatamente antes da adição (P_0), tal como ilustrado na Figura 24, de forma a ter uma

variação percentual do efeito do H_2O_2 no metabolismo, torna-se evidente o efeito de hormese do H_2O_2 no metabolismo da *S. cerevisiae* em fase exponencial, Figura 25. Este efeito observado enquadra-se na definição de hormese que é caracterizada por uma relação dose-resposta bifásica, produzindo características curvas dose-resposta em forma de U ou U-invertido [64].

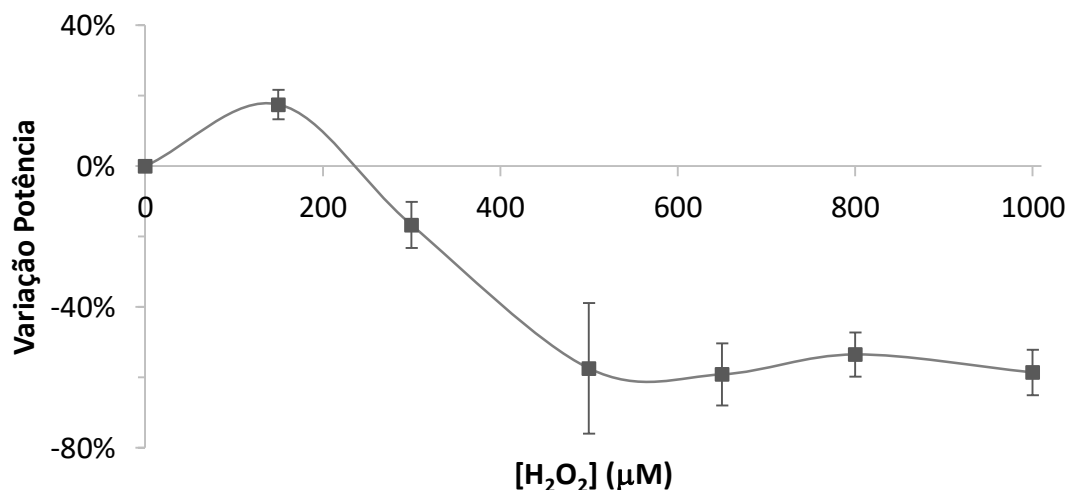


Figura 25 – A variação relativa da potência de *S. cerevisiae* a crescer em fase exponencial, medida imediatamente após exposição a H_2O_2 produz uma curva dose-resposta bifásica (hormese). A variação da potência foi calculada dividindo a diferença entre a potência antes e após a adição de H_2O_2 (ΔP) pela potência antes da adição (P_0).

4.5. Cinética de morte da *S. cerevisiae* a uma dose letal de H_2O_2

No capítulo anterior observou-se uma relação entre a dose de H_2O_2 administrada e a resposta calorimétrica, com efeito hormético à concentração de 150 μM . Anteriormente já foi observado para outra estirpe de *S. cerevisiae* [66], para *Escherichia coli* [110] e *Salmonella typhimurium* [111] um efeito estimulatório do H_2O_2 em doses subletais horméticas sob a viabilidade celular. Contudo é também conhecido o efeito tóxico que doses elevadas deste oxidante produzem na célula, devido à oxidação de componentes celulares.

Com o objetivo de analisar o efeito de diferentes concentrações de H_2O_2 na viabilidade celular traçou-se uma curva dose-resposta. Estas curvas normalmente são apresentadas na sua forma semi-logarítmica com o eixo das abcissas representado como logaritmo da concentração, adotando uma forma sigmoide característica.

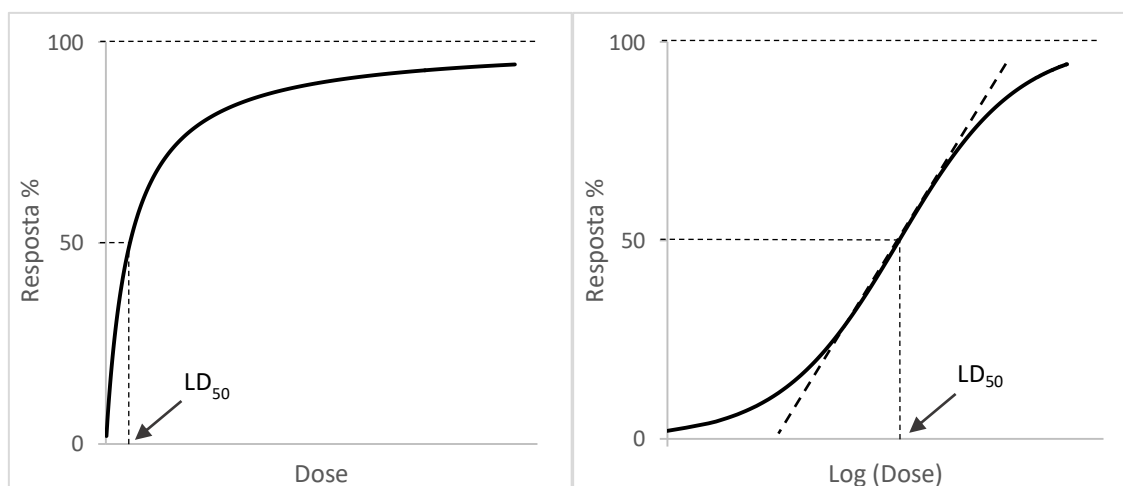


Figura 26 – Diferentes representações da curva de dose resposta. À esquerda encontra-se a representação da variável resposta em função da dose administrada de um composto que se pretende estudar; à direita encontra-se a representação da resposta em função do logaritmo da dose.

A curva dose-resposta do efeito do H_2O_2 ao nível do crescimento celular da *S. cerevisiae* medindo como variável de resposta a viabilidade celular da *S. cerevisiae* ao fim de um tempo de duplicação (90 minutos) após adição de H_2O_2 é mostrada na Figura 27.

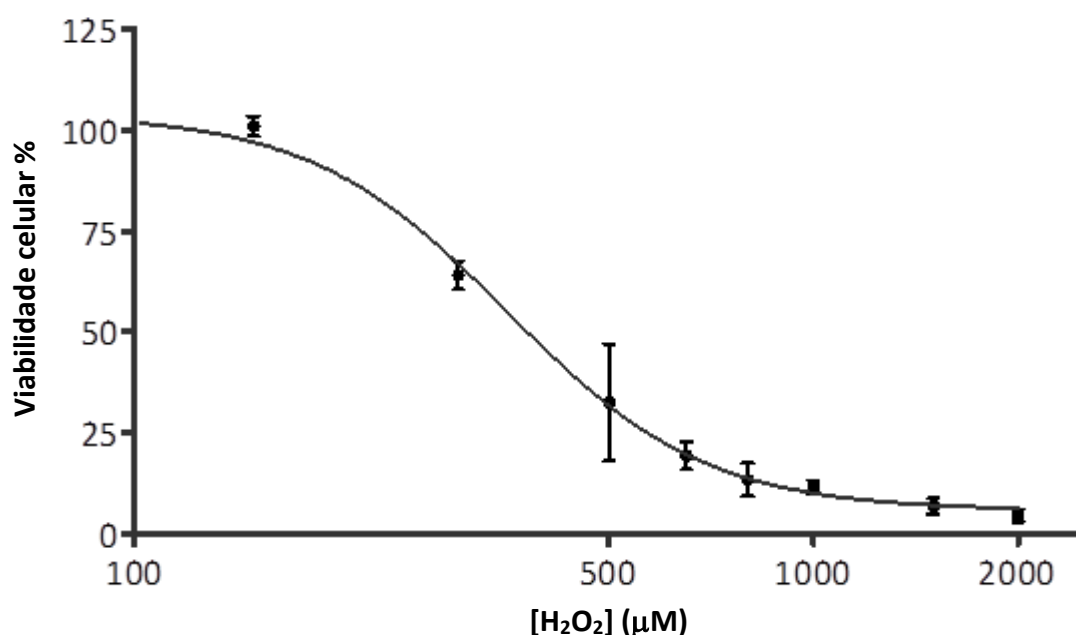


Figura 27 - Curva dose-resposta do efeito do H₂O₂ na viabilidade celular de *S. cerevisiae*. As células foram crescidas até aos 0.25 OD₆₀₀ e divididas (amostras emparelhadas) em amostras tratadas com H₂O₂ e controlo, o H₂O₂ foi adicionado e as culturas foram incubadas durante 90 minutos e plaqueadas em triplicado em placa YPD. A viabilidade celular (%) foi calculada dividindo os CFU do tratamento relativamente ao controlo. A regressão não-linear sigmoide ajustada aos pontos experimentais foi obtida no software GraphPad Prism6®, através da seguinte equação: Viabilidade celular (%) = limite inferior + $\frac{\text{limite superior} - \text{limite inferior}}{1 + 10^{(\log(LD_{50}/[H_2O_2]) \times h)}}$, onde LD₅₀ é a dose que mata 50% da população e h é o coeficiente de Hill. Os pontos representam o valor médio de pelo menos 3 replicados biológicos (n≥3) e as barras de erro representam o desvio padrão.

Com os dados experimentais obtidos foi possível ajustar uma regressão não-linear sigmoide (Figura 27), tendo-se obtido um LD₅₀ (dose que mata 50% da população) de $354.3 \pm 20.6 \mu\text{M}$ dado pela mesma regressão. Este valor é mais baixo que o valor de $650 \mu\text{M}$ determinado para outra estirpe (RZ53-6) de *S. cerevisiae* [66]. Curiosamente, a curva dose-resposta obtida para a estirpe BY4741 não apresenta evidências de um efeito de hormético (às concentrações estudadas) relativamente à viabilidade celular para concentrações subletais de H₂O₂. A viabilidade celular após exposição a $150 \mu\text{M}$ é $101 \pm 2 \%$ (n = 4), contudo é evidente a existência de um limiar na concentração de H₂O₂, que é próximo dos $150 \mu\text{M}$ e a partir do qual a concentração de H₂O₂ começa a afetar a viabilidade celular. Este limiar é inferior na estirpe BY4741, relativamente a outras (RZ53-6 e YPH250) para as quais não se observou efeito de toxicidade para concentrações inferiores a $400 \mu\text{M}$ de H₂O₂ (zona hormética) [66] [67], sugerindo que a estirpe BY4741 é mais sensível ao *stress* oxidativo do que outras estirpes usadas.

A curva dose-resposta obtida é caracterizada por uma diminuição menos acentuada da viabilidade celular em função da concentração às concentrações mais elevadas testadas, tornando-se necessário um grande aumento da concentração de H₂O₂ para diminuir ainda mais a viabilidade celular. Com o objetivo de perceber como é o comportamento da população celular durante a exposição a estas concentrações

elevadas, foi-se analisar a cinética de morte da BY4741 ao longo do tempo quando exposta a uma concentração letal de H_2O_2 (1 mM) com e sem adaptação, Figura 28.

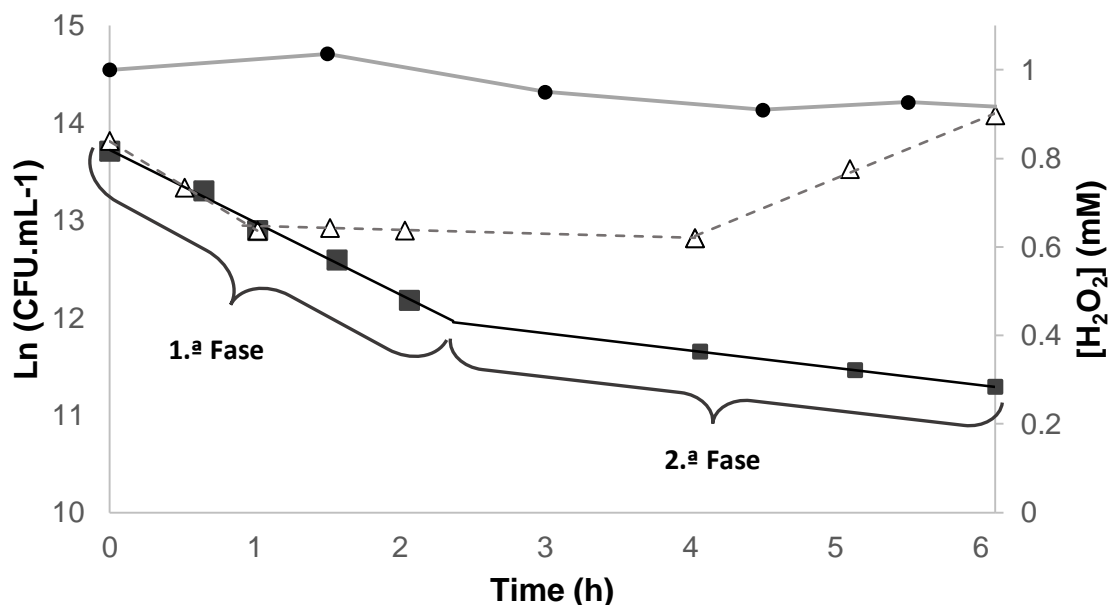


Figura 28 - Cinética de morte da *S. cerevisiae* BY4741 após exposição a uma dose letal de H_2O_2 com (Δ) e sem (\blacksquare) adaptação prévia. As células foram crescidas até aos 0.25 OD_{600} e só então foi feita uma diluição de 1/20 para novo meio termostatzado e as células foram incubadas durante 90 minutos com ou sem (controlo) 150 μM de H_2O_2 e só então foi adicionado 1mM H_2O_2 à densidade celular de 0.025 OD_{600} para ter um consumo baixo de H_2O_2 e assim obter uma concentração estacionária de H_2O_2 ao longo do ensaio. A primeira e segunda fase encontram-se assinaladas na figura para a cultura não adaptada. Representa-se a concentração de H_2O_2 ao longo do ensaio (\bullet) para a cultura não adaptada, sendo idêntico o perfil para as culturas adaptadas.

Na Figura 28 pode-se observar que após exposição a uma dose estacionária e letal de H_2O_2 , as células apresentam uma cinética de decaimento exponencial bifásica, semelhante ao efeito produzido pelos antibióticos nas bactérias [112]. A primeira fase inicia-se imediatamente após a adição de H_2O_2 às células (0h) e consiste na morte das células mais suscetíveis da população. Esta fase tem uma duração de 2 – 2.5 h nas células não adaptadas, sendo menor nas células previamente adaptadas ao H_2O_2 (1h). Depois segue-se uma segunda fase, que dura aproximadamente 3h, em que a população se torna mais resistente ao H_2O_2 e menos células morrem por unidade de tempo com a mesma concentração de 1 mM H_2O_2 .

Após as duas primeiras fases de morte celular, as células conseguem retomar o seu crescimento exponencial. Apesar de no ensaio representado na Figura 28 não ser o caso, as células não adaptadas também começam a proliferar aproximadamente às 5h (observado em outros 2 ensaios), quando a concentração de H_2O_2 ainda é próxima de 1 mM. Isto implica uma capacidade aperfeiçoada de lidar com o *stress* oxidativo por parte das células.

Curiosamente, as células previamente adaptadas produziram o mesmo padrão das células não adaptadas, com as mesmas duas fases do decaimento exponencial, indicando que numa população isogénica nem todas as células se conseguem adaptar da mesma forma num protocolo de adaptação

típico. A adaptação apesar de não alterar o declive associado à perda de viabilidade na primeira fase (relativamente ao controlo não adaptado), diminuiu com sucesso a duração desta primeira fase. Desta forma a morte celular nesta fase diminui, comprovando que a exposição a uma dose adaptativa de H_2O_2 resulta numa maior resistência e sobrevivência a uma dose letal de H_2O_2 posterior, tal com já tinha sido descrito na literatura [56] [57] [63] [66].

Os declives da primeira fase em culturas adaptadas e não adaptadas aparentemente não são diferentes, apontando para que o aumento da sobrevivência ao H_2O_2 observado nas células adaptadas não esteja correlacionado com uma maior capacidade inicial das células sobreviverem ao H_2O_2 . Alternativamente, a justificação pode residir numa adaptação mais rápida visto as células adaptadas iniciarem a segunda fase cerca de 1 hora mais cedo, o que permite à população conservar mais sobreviventes. Na segunda fase, as células da cultura previamente adaptada apresentam uma taxa de morte significativamente inferior ($0.07 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ (n=2)) às culturas não adaptadas ($0.19 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ (n=3)) (P-value = 0.016), sendo portanto mais resistentes ao *stress*. Resumidamente, a exposição das células a uma dose subletal de H_2O_2 torna o processo de adaptação a uma dose maior mais rápido.

Este resultado é curioso pois já tinham sido relatados diversos intervenientes no processo de adaptação como aumento dos catalases e peroxidases e uma diminuição da permeabilidade membranar ao H_2O_2 como elementos chave na adaptação celular. Contudo essa adaptação aparenta estar incompleta pois observa-se a mesma cinética de morte celular em células já adaptadas e não adaptadas (primeira fase) e só então é que as células se adaptam (segunda fase) e passam a morrer muito menos. Uma hipótese é que em células previamente adaptadas os níveis de catalase são mais elevados e/ou a permeabilidade membranar menor mas não o suficiente e portanto as células vão morrendo, contudo as que sobrevivem vão aumentando os níveis de expressão desses enzimas e/ou diminuindo a permeabilidade membranar até atingir um limiar que permite a manutenção de um gradiente de H_2O_2 mais estável para a sobrevivência celular. Segundo esta hipótese, as células adaptadas apresentam uma vantagem por estarem mais próximo desse limiar do que as não adaptadas, permitindo-lhes adaptarem-se mais rápido (ter uma primeira fase menor) e assim morrer menos.

4.5.1. Cinética de morte da estirpe ZWF1Δ

O aumento da resistência da população ao H_2O_2 pode ser devido a um aumento genuíno da resistência por adaptação celular ou então pode ser o somatório da morte com alguma proliferação celular que começa a surgir. De forma a testar qual das hipóteses é válida, foi-se analisar a cinética de morte da estirpe ZWF1Δ, Figura 29, deletada no gene que codifica para o enzima 6-fosfato de glucose desidrogenase (G6PDH), o primeiro enzima da via dos fosfatos de pentose (PPP), tendo esta estirpe uma dificuldade evidente na produção de NADPH.

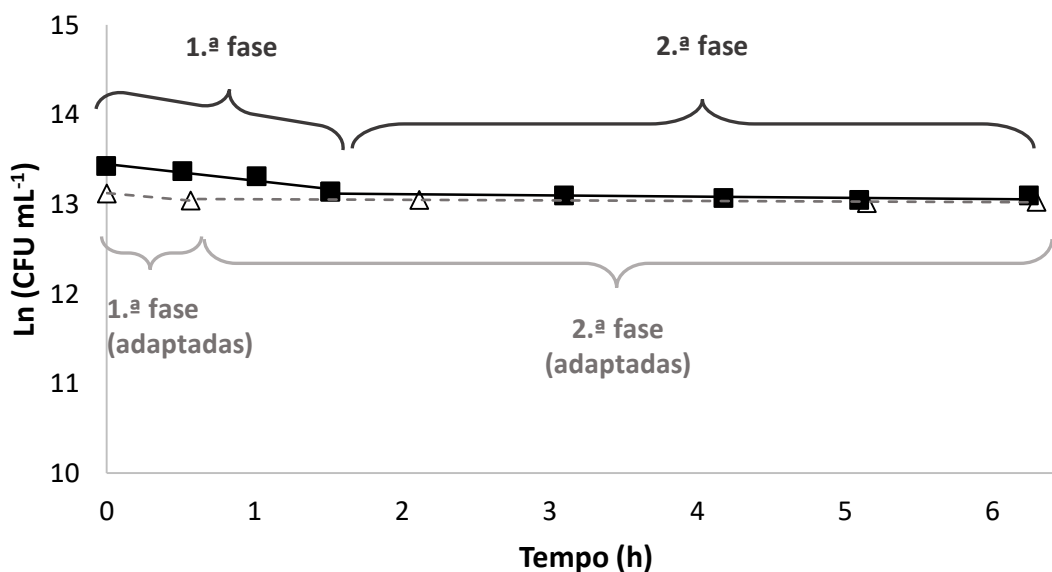


Figura 29 - Cinética de morte do mutante ZWF1Δ ao longo do tempo após exposição a uma dose letal de H_2O_2 com (Δ) e sem (■) adaptação prévia. O protocolo foi idêntico ao anterior descrito (ver legenda da Figura 28). A primeira e segunda fase encontram-se assinaladas na figura para as culturas não adaptadas e adaptadas.

Contraintuitivamente a estirpe ZWF1Δ é mais resistente ao *stress* oxidativo que a estirpe *wt*, com uma primeira fase com um declive muito menos acentuado, na qual ocorre muito menos morte celular, e uma segunda fase em que não há praticamente morte celular. Quando as células ZWF1Δ são expostas a uma dose subletal (para as *wt*) de 150 μ M de H_2O_2 a duração da primeira fase parece diminuir mas isso deve-se ao facto das células mais suscetíveis da população já terem morrido durante o protocolo de adaptação (cerca de 25% da população), sendo a sobrevivência na segunda fase, com e sem adaptação exatamente igual (mesmos CFU mL⁻¹), confirmando resultados anteriores de que a deleção do G6PDH torna as células incapazes de se adaptar quando expostas a uma dose subletal de H_2O_2 [57].

Resumidamente, tem-se que a sobrevivência da ZWF1Δ é completamente inalterada por um protocolo de adaptação comum, sendo que a dose adaptativa normalmente usada com outras estirpes é letal nesta estirpe. Apesar de uma subpopulação desta estirpe ser bastante sensível ao H_2O_2 , esta estirpe é resistente a concentrações letais de H_2O_2 , evidenciado pela presença de uma segunda fase com um fenótipo “super-resistente” ao H_2O_2 . Esta segunda fase contudo prolonga-se durante pelo menos 50 horas (aproximadamente o tempo que demora a consumir todo o H_2O_2), antes das células começarem a

proliferar novamente, sugerindo que o G6PDH é de facto essencial para fornecer NADPH suficiente para a resposta antioxidante e proliferação celular simultaneamente, sendo estes mutantes incapazes de proliferar na presença de H_2O_2 , ao contrário das estirpes *wt* (Figura 28), tal como vem sido descrito na literatura [70] [113] [114]. Esta “super-resistência” poderá estar associada a maiores níveis de expressão de enzimas antioxidantes [56] [57] e menor permeabilidade da membrana ao H_2O_2 [63] como uma adaptação consequente do *knockout* ou do crescimento *batch* na presença de oxigénio (que poderá gerar uma baixa concentração de ROS intracelulares que possa ser adaptativa).

Noutra publicação foi descrita uma maior morte celular em estirpes deletadas para o gene do G6PDH do que em *wt* após uma exposição a uma dose letal de H_2O_2 [57]. Para além da estirpe ser diferente e a concentração usada de H_2O_2 nesse ensaio ser superior (2mM), o que pode desencadear uma resposta diferente, a diferença essencial poderá estar no facto desse ensaio ter sido realizado em tampão de fosfatos e neste trabalho em meio de cultura. A ZWF1 Δ em situação de *stress* tem de captar precursores para a síntese de NADPH (através de outras vias metabólicas menos eficientes que a PPP), de enzimas antioxidantes e para a remodelação da membrana plasmática, para conseguir sobreviver na presença de elevadas concentrações de H_2O_2 , sendo que o meio de cultura deverá ser essencial neste processo, enquanto um tampão é limitante. A situação de fome estabelecida impede a indução da atividade dos enzimas antioxidantes atenuando a sua síntese *de novo* e/ou promovendo a depleção de NADPH [62]. Este efeito já foi descrito no estudo da importância da catalase na resposta ao *stress*, sendo a viabilidade celular de uma estirpe *wt* e mutantes para o catalase citosólico igual quando o ensaio é feito em tampão, sugerindo que o catalase não é essencial na resposta ao *stress* oxidativo [56]. Contudo quando o mesmo protocolo é feito em meio de cultura o mutante para o catalase citosólico revela-se hipersensível ao H_2O_2 , quando comparado à *wt* que aumenta bastante a atividade do catalase devido à síntese *de novo* da enzima [62].

A estirpe ZWF1 Δ apresentou uma clara dificuldade de crescimento em meio SC, tendo demorado cerca de 9h a atingir os 0.25 OD₆₀₀ (mais 3h que em meio CAA) devido a uma diminuição contínua da sua taxa de crescimento (Figura S6), sendo que em meio CAA não se observou este efeito do meio. Isto sugere que esta estirpe apresenta um consumo aumentado de algum nutriente presente neste meio, possivelmente metionina que está em défice e já foi documentado que a deleção de G6PDH aumenta o consumo de enxofre orgânico na forma de metionina [114]. Mais uma vez ficam evidentes as limitações nutricionais do meio SC que impedem um crescimento exponencial sem restrições, desta vez numa estirpe mutante ZWF1 Δ , não sendo este meio indicado para a cultura deste mutante.

O facto da estirpe ZWF1 Δ conseguir apresentar uma segunda fase, em que a morte celular é muito reduzida, é indicativo que esta fase não resulta do somatório da morte celular e proliferação celular simultaneamente, uma vez que esta estirpe é incapaz de proliferar na presença de H_2O_2 , Figura S7. Portanto a segunda fase, observada em *wt* e ZWF1 Δ , deverá ser mesmo dependente de um aumento da resistência ao *stress* induzido.

4.5.2. Recuperação após uma dose letal de H₂O₂

Foi feita uma análise referente ao tempo que as células demoram a prosseguir o seu crescimento exponencial após a exposição a uma dose letal de H₂O₂. A quantificação foi feita através da medição das áreas das colónias expostas ao H₂O₂, durante diferentes tempos de incubação, após exatamente 24 horas de crescimento em placa, Figura 30.

Na Figura 30A é possível observar que as áreas das colónias variam consoante a duração da exposição ao H₂O₂. A média das áreas (Figura 30B) durante a primeira hora e meia tende a diminuir ao longo do tempo, o que equivale a dizer que as células passaram cada vez menos tempo em crescimento exponencial durante essas 24 horas, ou seja, com o aumento do tempo de exposição ao H₂O₂ as células tendem a demorar mais tempo a retomar o crescimento exponencial. Possivelmente este atraso reflete a demora causada na reparação dos danos celulares causados pelo *stress* oxidativo. A média das áreas deixa de diminuir e passa a aumentar na mesma altura em que se dá a mudança de declives no perfil de morte, tendo-se encontrado o mesmo perfil para células adaptadas e não adaptadas.

Quando a cinética de morte entra no segundo declive, sensivelmente às 1.5 horas, a média das áreas começa a aumentar novamente, surgindo duas subpopulações distintas (Figura 30C): uma subpopulação que tem mais dificuldade em retomar o crescimento exponencial (área de colónia pequena <35 mm²); e uma outra subpopulação que retoma o crescimento exponencial mais rapidamente, semelhante às células não expostas a H₂O₂ (área de colónia grande >35 mm²). A primeira subpopulação é cada vez menor com o aumento do tempo de exposição ao H₂O₂ enquanto a segunda população é cada vez maior, sendo que ao fim de 6h praticamente toda a população consiste neste segundo lote de células (Figura 30C), tendo readquirido a distribuição de áreas do tempo zero.

O facto de algumas das células formarem colónias com áreas grandes, ou seja, retomarem imediatamente o crescimento após plaqueamento não significa que estivessem a crescer no meio de cultura na presença de H₂O₂. Apenas significa que na ausência de H₂O₂ estas tiveram capacidade de retomar o crescimento exponencial imediatamente, não tendo necessidade de “reparações intracelulares” de danos causados pelo elevado *stress* oxidativo, sobretudo danos causados no DNA que se sabe causar uma paragem do ciclo celular [115] [116] [117].

Após a morte celular causada pelo H₂O₂, as células vão recuperando a sua capacidade de crescimento exponencial, em placa, na ausência de H₂O₂. Contudo, o crescimento exponencial na presença de H₂O₂ tem início, apenas, quando toda a população readquire a sua capacidade proliferativa inicial, anterior ao estímulo de H₂O₂ (0 h) (Figura 30B). Analisando a fração de células com áreas grandes, observa-se um aumento contínuo desta fração desde as 1.5h (altura em que é mínima, 20%) até às 5h (Figura 30C). É neste momento que a população retoma a sua distribuição inicial (0 h, 80%), relativamente à fração de colónias grandes e pequenas (Figura 30C), e o crescimento exponencial em placa, na presença de H₂O₂, tem início (Figura 30B). Estes resultados indicam que o crescimento na

presença de H_2O_2 é retomado, apenas, quando toda a população (e não cada célula) readquire a sua capacidade proliferativa inicial, independentemente de já haver células prontas a iniciar a proliferação (colônias grandes), sugerindo um nível de regulação da proliferação ao nível da população.

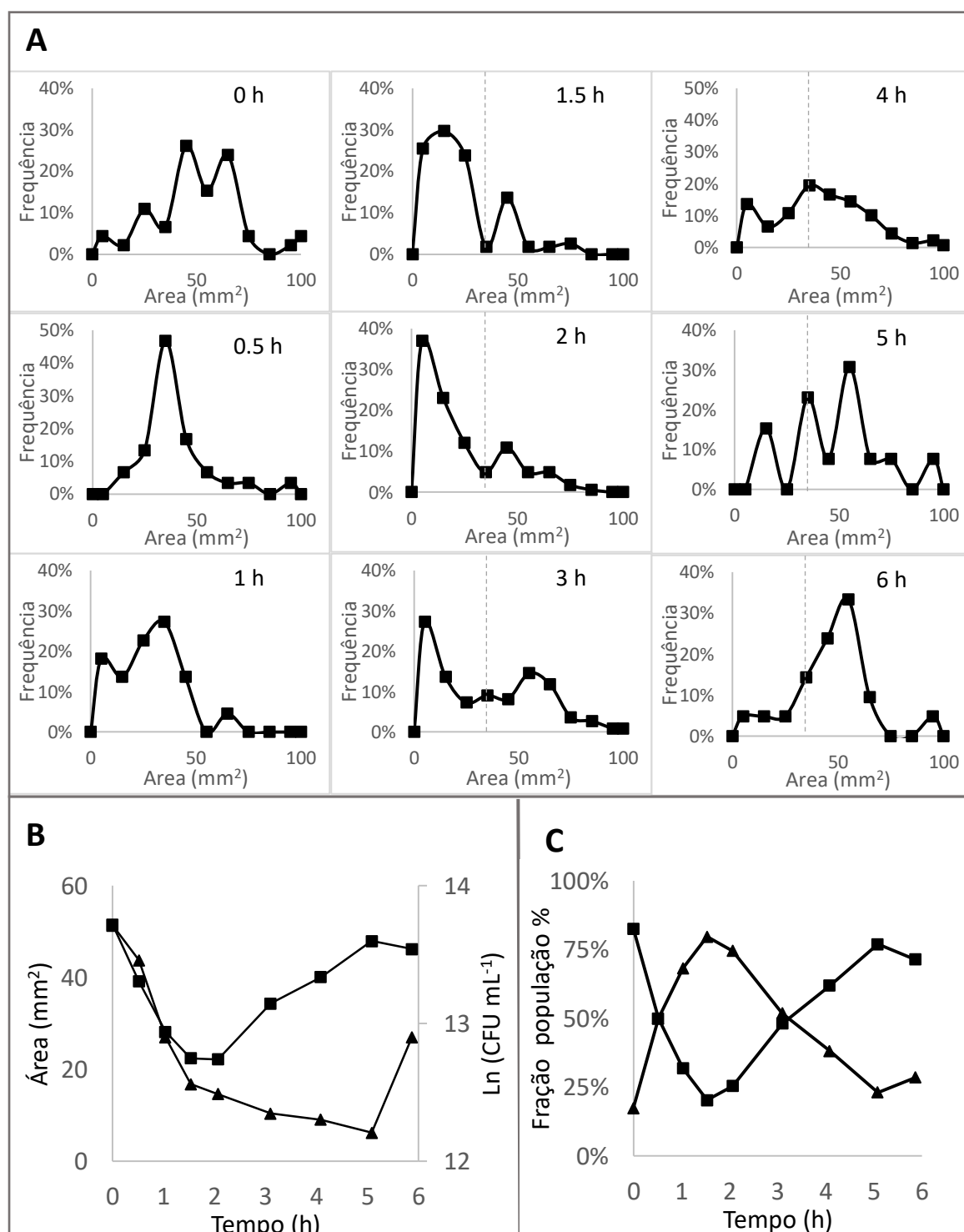


Figura 30 – Área das colônias de *S. cerevisiae* previamente adaptadas com 150 μM H_2O_2 após exposição a uma dose letal de H_2O_2 ao longo do tempo. **A)** Foi usado o mesmo protocolo descrito anteriormente para a cinética de morte (ver legenda da Figura 28). As áreas das colônias foram medidas exatamente 24h após plaqueamento e quantificadas usando o software ImageJ®. **B)** Representa-se a média das áreas das colônias (■) e os CFU mL⁻¹ (cinética de morte) (▲). **C)** Representam-se as frações da população correspondente a células que produziram colônias pequenas (inferiores a 35 mm²) (■) e colônias grandes (superior a 35 mm²) (▲).

4.6. Efeito da adição de doses subletais de H_2O_2

Tendo-se estudado o efeito de concentrações letais ao nível da viabilidade celular, vai-se agora estudar qual o efeito de concentrações subletais no metabolismo da *S. cerevisiae*, quando não há efeito ao nível da viabilidade, mas há um efeito hormético no metabolismo.

Deste modo começou por se estudar o efeito das adições *bolus* de H_2O_2 , em culturas de *S. cerevisiae* em fase exponencial, na curva calorimétrica. As células foram crescidas até aos 0.25 OD₆₀₀ e só então foi adicionado a primeira dose de 150 μ M de H_2O_2 , passados 40 minutos foi adicionado outra dose de 150 μ M e por fim passados outros 40 minutos foi adicionada a última dose, também de 150 μ M. A curva calorimétrica é semelhante às curvas controlo (pelo que não há necessidade de apresentar nenhuma curva como exemplo), apenas com um aumento temporário da potência dissipada imediatamente a seguir às adições de H_2O_2 que se encontra representado na Figura 31, tal como já se tinha observado na Figura 24.

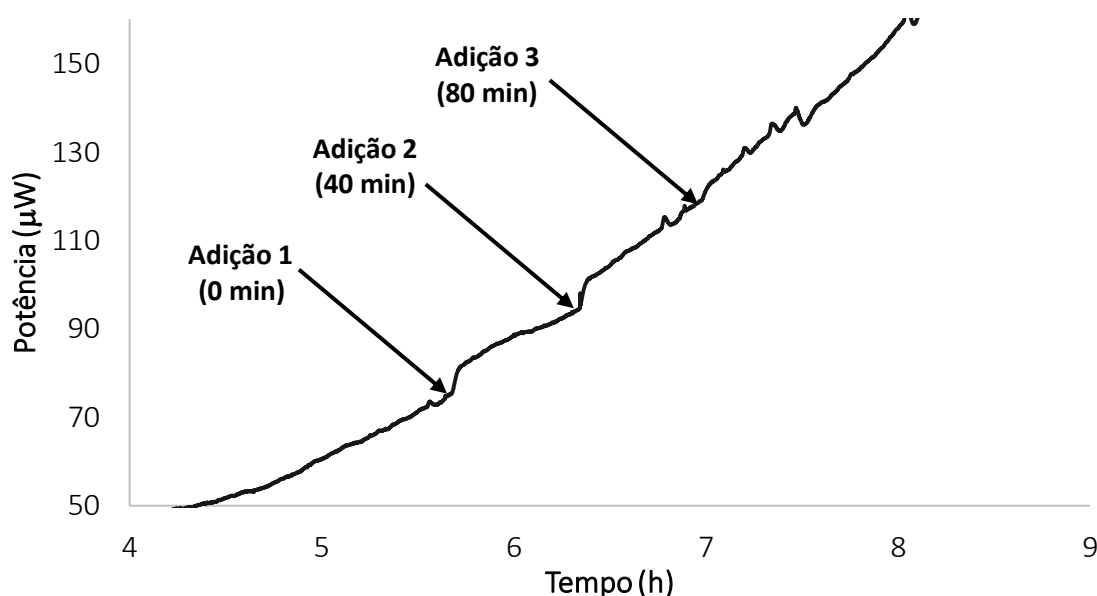


Figura 31 – As adições *bolus* de H_2O_2 causam um aumento imediato na potência dissipada de uma população de *S. cerevisiae* em fase exponencial. A primeira adição de H_2O_2 foi feita aos 0.25 OD₆₀₀, e as seguintes foram feitas em intervalos de 40 minutos.

Os parâmetros calorimétricos mais relevantes das curvas calorimétricas das culturas controlo e das culturas sujeitas às 3 adições *bolus* de H_2O_2 , encontram-se resumidos no Quadro 4.

Como se pode observar no Quadro 4, não houve qualquer diferença relativamente ao tempo em que ocorrem os picos característicos de uma curva calorimétrica de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC, sendo o mesmo válido para as potências atingidas nesses máximos entre as culturas controlo e as sujeitas às 3 adições *bolus* de H_2O_2 . O integral da curva calorimétrica desde o início (fase *lag*) até ao máximo da curva ou até à fase estacionária não é estatisticamente diferente entre as culturas controlo e as sujeitas

às adições *bolus*. Contudo, o integral até ao 1.º máximo da curva calorimétrica é claramente superior nas culturas expostas a H₂O₂ (cerca de 14%).

Quadro 4 – Descrição dos parâmetros da curva calorimétrica das culturas de *S. cerevisiae* controlo e sujeitas a 3 doses subletais (150 µM) de H₂O₂. O ΔH foi determinado a partir do integral da curva calorimétrica desde o início da fase lag até ao ponto em questão. **, p-value < 0.01; ^{NS}, p-value > 0.05.

	Controlo			Adições <i>bolus</i> (3x 150 µM)		
	Tempo (h)	P (µW)	ΔH (kJ dm ⁻³)	Tempo (h)	P (µW)	ΔH (kJ dm ⁻³)
1.º máximo	11.77 ± 0.45 (n = 5)	316 ± 11 (n = 5)	7.38 ± 0.19 (n = 4)	11.67 ± 0.26 (n = 8) ^{NS}	321 ± 11 (n = 9) ^{NS}	8.41 ± 0.54 (n = 9)**
P máximo	14.91 ± 0.52 (n = 5)	365 ± 17 (n = 5)	14.36 ± 0.73 (n = 5)	14.39 ± 0.44 (n = 8) ^{NS}	347 ± 17 (n = 9) ^{NS}	14.46 ± 0.49 (n = 6) ^{NS}
Fase estacionária	16.38 ± 0.32 (n = 5)	35 ± 4 (n = 5)	16.83 ± 0.42 (n = 4)	16.09 ± 0.23 (n = 7) ^{NS}	34 ± 5 (n = 7) ^{NS}	17.03 ± 1.01 (n = 8) ^{NS}

De forma a comprovar se existe um aumento do catabolismo, analisou-se as diferenças entre as culturas controlo e exposta às adições *bolus* ao nível da densidade celular (Quadro 5). Porque a diferença esperada é baixa, esta foi ensaiada recorrendo a amostras emparelhadas como forma de diminuir a heterogeneidade da amostra. Esta análise emparelhada foi possível porque não existe diferença no tempo em que ocorrem os picos da curva calorimétrica e portanto quando as culturas controlo atingem o primeiro pico da curva calorimétrica, as culturas expostas ao H₂O₂ também o atingem nessa altura e portanto pode-se comparar os OD₆₀₀ de duas culturas emparelhadas em que numa foram adicionadas as 3 adições *bolus* de H₂O₂ e a outra é controlo.

Quadro 5 - Densidade celular (OD₆₀₀) de culturas expostas a 3 doses subletais de 150 µM de H₂O₂ e controlos. O teste estatístico aplicado foi o teste T para amostras emparelhadas. **, p-value < 0.01; ^{NS}, p-value > 0.05 (Não significativo).

	OD ₆₀₀	
	Controlo	Adições <i>bolus</i> (3x 150 µM)
1.º máximo	1.84 ± 0.10 (n = 5)	1.78 ± 0.09 (n = 5)**
P máximo	3.14 ± 0.15 (n = 5)	3.11 ± 0.18 (n = 5) ^{NS}
Fase estacionária	3.66 ± 0.10 (n = 5)	3.74 ± 0.16 (n = 5) ^{NS}

No Quadro 5 pode-se observar que a densidade celular é idêntica em ambos os casos, à exceção do primeiro pico, onde a entalpia associada ao metabolismo também é diferente. As adições *bolus* causam uma diminuição de cerca de 3% na densidade celular, isto é no anabolismo. Sendo que o anabolismo diminui, a componente catabólica deverá aumentar cerca de 3%, no entanto este aumento de catabolismo não é suficiente para justificar a diferença nos valores observados de entalpia no 1.º pico pois um aumento de 3% no catabolismo traduz-se num aumento de 3% no valor de entalpia relativamente ao controlo.

Uma hipótese é que o H_2O_2 em doses subletais pode acelerar o consumo de glucose por parte da *S. cerevisiae* até ao primeiro pico e diminuir após o primeiro pico. Tal como já se viu anteriormente a entalpia associada ao metabolismo é totalmente dependente do consumo de glucose. Para justificar o aumento de 14% na entalpia até ao primeiro pico, assumindo o ganho energético de $134.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ glucose, teria de se verificar um aumento do consumo de glucose na ordem dos 8 mM nas culturas expostas ao H_2O_2 . Na Figura 32 pode-se observar que o consumo de glucose entre duas culturas emparelhadas (uma foi exposta às 3 adições *bolus* e a outra é controlo) é exatamente o mesmo, produzindo curvas que se sobrepõem e que são praticamente indistinguíveis. Mais importante, pode-se constatar que a concentração de glucose no momento em que ocorre, normalmente, o primeiro máximo nas curvas calorimétricas (11 – 12 h) é exatamente a mesma. Portanto, o aumento da entalpia no primeiro máximo não é causado por um aumento no consumo de glucose. Há uma ligeira diferença nas duas curvas entre as 6 e 9h, mas não se considerou relevante e deverá estar associada a erro experimental, isto pois não foi observado este comportamento noutros ensaios realizados (dados não apresentados).

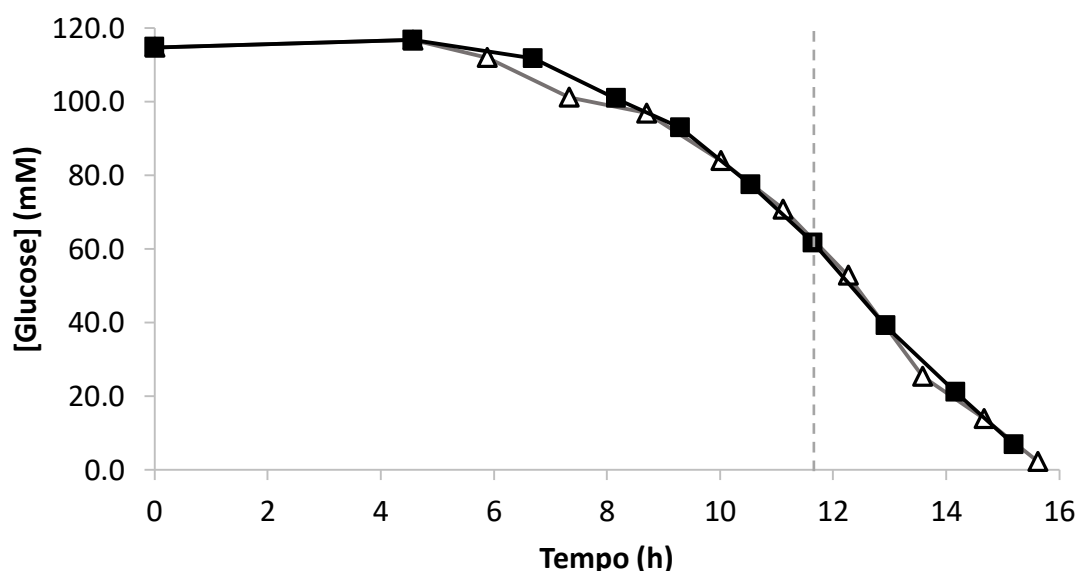


Figura 32 - Consumo de glucose em amostras emparelhadas de células expostas a 3 adições bolus de $150 \mu\text{M } H_2O_2$ (Δ) e células não expostas (controlo - ■). A linha a tracejado assinala o tempo em que normalmente ocorre o primeiro máximo nas curvas calorimétricas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC.

Uma hipótese alternativa que pode justificar um aumento da entalpia associada ao metabolismo até ao primeiro pico, sem aumento do consumo de glucose, é um aumento da respiração causado pelo H_2O_2 . Mais uma vez foi-se testar esta hipótese recorrendo a amostras emparelhadas, pois as diferenças podem ser bastante subtis, de forma a reduzir o ruído associado à heterogeneidade das amostras, Figura 33.

Curiosamente, a adição de H_2O_2 causa uma diminuição imediata do consumo de O_2 , portanto também não deverá ser devido a um hipotético aumento da respiração que a entalpia até ao primeiro pico aumenta. Esta diminuição da respiração que acontece imediatamente após a adição de H_2O_2 é

transiente, perdendo-se ao fim de 1.5 – 2 horas, voltando a respiração a ser igual nas células controle e expostas às adições *bolus*.

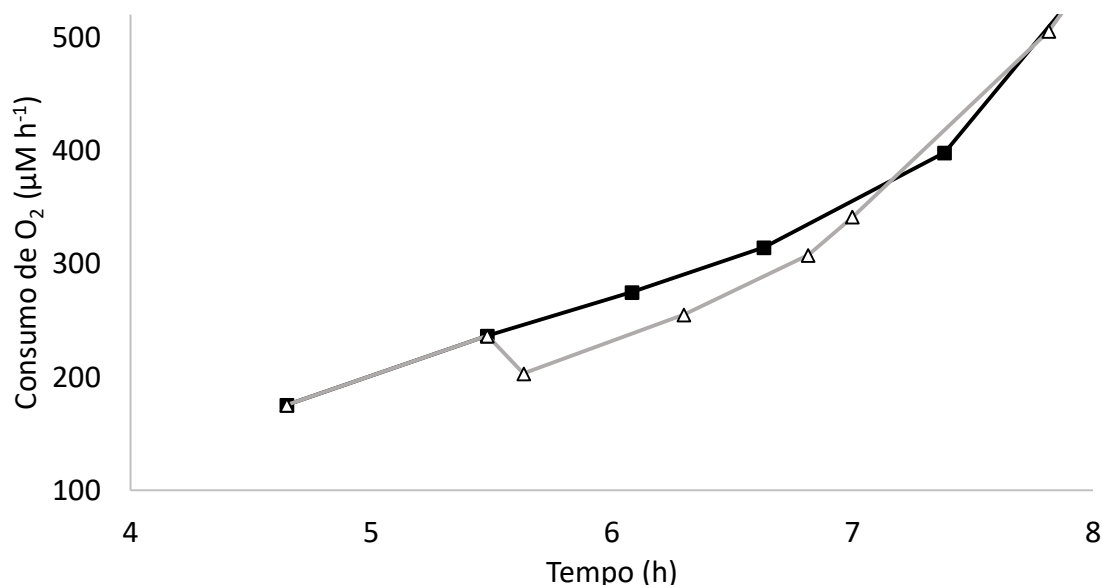


Figura 33 – Adição de H₂O₂ a culturas de *S. cerevisiae* em crescimento exponencial em glucose causa uma diminuição imediata no consumo de O₂. Representa-se o consumo de O₂ em amostras emparelhadas de uma cultura de *S. cerevisiae* exposta a 3 adições bolus de 150 µM H₂O₂ (Δ) e uma cultura não exposta a H₂O₂ (controle - ■).

A medida experimental do consumo de O₂ pode ser afetada após a adição de H₂O₂ devido à liberação de O₂ na resposta antioxidante imediata mediada pelo catalase. Em levedura estima-se que a maior parte da atividade antioxidante é devida ao catalase citosólico e ao citocromo c peroxidase mitocondrial [70], sendo que o catalase é o único que liberta O₂ na sua reação. Assumindo portanto uma cinética de primeira ordem para o consumo de H₂O₂, tem-se que:

$$v_{\text{produção O}_2} = -v_{\text{consumo H}_2\text{O}_2 \text{ por catalase}} = -k_{\text{catalase}} \times [\text{H}_2\text{O}_2] \times OD_{600} \quad (22)$$

A partir da equação (22), assumindo a constante de consumo de H₂O₂ pelo catalase (k_{catalase}) igual a $-0.030 \text{ min}^{-1} OD_{600}^{-1}$ [63], sendo a concentração de H₂O₂ inicial 150 µM e aplicada aos 0.25 OD₆₀₀, chega-se ao valor máximo de 67.5 µM h⁻¹. A medição da respiração foi feita em média nos 10 minutos subsequentes à adição *bolus*, sendo que nesse período de tempo (tendo em conta o aumento do número de células e o consumo de H₂O₂) a velocidade de produção de O₂ varia entre 67.5 e 61.5 µM h⁻¹ sendo o valor médio nesses 10 minutos 64.5 µM h⁻¹. O valor da respiração para a cultura controle aos 0.25 OD₆₀₀ é cerca de $231 \pm 14 \text{ µM h}^{-1}$ (n=3), portanto a resposta antioxidante dependente do catalase justifica uma diminuição da respiração de cerca 27-29 %. A diminuição observada é ligeiramente inferior, $23.4 \pm 4.7 \%$ (n=4), mas dentro do erro experimental esta diferença não deverá ser significativa, portanto assume-se que a diminuição da velocidade de consumo de O₂ é consequência da liberação de O₂ na reação do catalase, e não devido a uma diminuição da respiração mitocondrial.

O efeito das adições também não é sempre o mesmo, diminuindo de intensidade na sequência de adições: na primeira adição observa-se uma diminuição do consumo de O₂ de $23.4 \pm 4.7 \%$ (n=4); na segunda adição *bolus* $13.9 \pm 4.2 \%$ (n = 3); e na terceira adição $5.8 \pm 2.3 \%$ (n = 2). Este efeito sugere que a resposta antioxidante dependente de catalase diminui com a adaptação das células ao H₂O₂, passando a resposta antioxidante a ser mediada por outras enzimas possivelmente.

Já se concluiu que não é devido ao aumento do consumo de glucose ou aumento da respiração que a entalpia associada ao metabolismo aumenta até ao primeiro máximo das curvas calorimétricas, comparativamente ao controlo. O facto do aumento ser apenas no primeiro máximo, que está associado a uma situação de fome ou “quase fome” de metionina, leva a questionar se a variação encontrada poderá estar associada a um efeito sinérgico entre fome e sinalização *redox*.

Foi-se então repetir as adições *bolus* mas desta vez utilizando um meio sintético extra suplementado de forma a garantir que não existia qualquer situação de fome. Este meio será designado de CAA extra e é igual ao CAA (evitando fome associada a aminoácidos) representado no Quadro 3, suplementado com o triplo de YNB (para evitar a depleção de inositol) e o dobro do uracilo que era o nutriente auxotrófico em maior défice neste meio (mas que, apenas, limita o crescimento na fase pós-diáuxica) (Figura S8).

As entalpias associadas ao metabolismo da *S. cerevisiae* a crescer em meio CAA extra com e sem as adições *bolus* de 150 µM H₂O₂ encontram-se resumidas no Quadro 6.

Quadro 6 - Descrição dos parâmetros da curva calorimétrica de culturas de *S. cerevisiae* controlo e sujeitas a 3 adições *bolus* subletais (150µM) de H₂O₂. O ΔH foi determinado a partir do integral da curva calorimétrica desde o início da fase lag até ao ponto em questão. Os resultados encontram-se apresentados na forma de média ± desvio padrão (n), em que (n) indica o número de experiências independentes realizadas; ^{NS}, p-value > 0.05 (não significativo).

	Controlo		Adições <i>Bolus</i> (3x 150 µM H ₂ O ₂)	
	Tempo (h)	ΔH (kJ L ⁻¹)	Tempo (h)	ΔH (kJ L ⁻¹)
Pico máximo	13.0 ± 0.2 (n=3)	13.63 ± 0.91 (n=3)	12.9 ± 0.3 (n=3) ^{NS}	14.11 ± 0.79 (n=3) ^{NS}
Fase estacionária	15.1 ± 1.1 (n=3)	16.54 ± 0.49 (n=3)	14.8 ± 0.6 (n=3) ^{NS}	17.19 ± 0.49 (n=3) ^{NS}

NOTA: As culturas sujeitas às 3 adições *bolus* foram crescidas até, aproximadamente, aos 0.20-0.25 OD₆₀₀ e só então transferidas para o calorímetro, de forma a garantir que a primeira adição *bolus* era feita aos 0.25 OD₆₀₀. A integração foi feita a partir dos 0.25 OD₆₀₀ e somou-se o valor de ΔH associado ao crescimento neste meio até aos 0.25 OD₆₀₀ (valor dos controlos), $0.551 \pm 0.067 \text{ kJ L}^{-1}$ (n = 4). Os valores de ΔH (e respetivo erro) apresentados para as adições *bolus* são o resultado dessa soma.

Analisando os resultados do Quadro 6 pode-se constatar que num meio sintético definido sem qualquer limitação nutricional (meio CAA extra) não existe evidência estatística de diferenças na entalpia associada ao metabolismo nos diversos pontos da curva calorimétrica ou nos tempos em que as culturas controlo e *bolus* atingem esses “pontos-chave” (Potência/pico máxima(o); inflexão causada pela depleção da glucose; fase estacionária). Face a estes resultados pode-se constatar que as adições *bolus*

não provocam qualquer alteração no rendimento energético das culturas de *S. cerevisiae* a crescer em glucose, não sendo o metabolismo significativamente afetado, ao contrário do que os ensaios feitos em meio SC levavam a crer. De igual forma, estes resultados reforçam a hipótese de que o aumento da entalpia do metabolismo da glucose até ao primeiro pico em meio SC possa resultar de um sinergismo entre uma resposta ao *stress* oxidativo e a uma situação de fome que deverá estar associada ao défice de metionina ou inositol.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo microcalorimétrico do crescimento de *S. cerevisiae* aliado a medidas auxiliares (densidade celular, respiração, glucose) permitiu determinar que o metabolismo da *S. cerevisiae* é altamente dinâmico durante toda a fase exponencial. Esta dinâmica é principalmente afetada por uma diminuição do metabolismo respiratório ao longo da fase exponencial. Este trabalho evidenciou a incapacidade do meio SC em proporcionar um crescimento sem limitações nutricionais da estirpe BY4741 devido a uma carência nutricional do aminoácido auxotrófico metionina e de inositol. Neste estudo, através de medidas microcalorimétricas foi possível observar um efeito de hormese do H_2O_2 em doses subletais sobre o metabolismo da *S. cerevisiae*, imediatamente após exposição ao oxidante, provavelmente como resultado da resposta antioxidante sem morte celular associada. A viabilidade de *S. cerevisiae* após exposição a uma dose letal de H_2O_2 é caracterizada por diferentes fases de adaptação ao *stress*, com diferentes suscetibilidades. Determinou-se que a via PPP desempenha neste capítulo um importante papel na desintoxicação e na adaptação celular ao H_2O_2 , de acordo com o já descrito na literatura [57] [118]. No entanto, células com esta via diminuída, além de não se conseguirem adaptar através de um protocolo típico de adaptação, apresentaram, surpreendentemente, uma resistência aumentada ao H_2O_2 , possivelmente devido a adaptações resultantes do *knockout* do gene ZWF1.

O carácter dinâmico da fase exponencial, observado ao longo deste trabalho, não é novidade pois este fenómeno já tinha sido anteriormente descrito em [12], através de análises de fluxo de produção de CO_2 , de consumo de O_2 e formação de ATP, incluindo ainda avaliação da resistência ao *stress*, alterações ao nível do transcriptoma e proteoma. Os resultados apresentados nesta Tese vêm, portanto, reforçar o conceito de dinâmica metabólica observado durante a fase exponencial de *S. cerevisiae*, recorrendo para tal, e pela primeira vez, a uma análise calorimétrica do metabolismo durante o crescimento exponencial de *S. cerevisiae*. A eficiência na obtenção de ATP da célula através de um metabolismo respiratório é muito superior à conseguida através de um metabolismo fermentativo. De um ponto de vista de eficiência energética, é contraintuitivo a célula optar por um metabolismo menos eficiente numa fase em que a necessidade energética para promover processos de biossíntese é elevada. Diversos mecanismos podem contribuir para a ocorrência da glicólise aeróbia. Uma possível explicação é que alterando para um metabolismo mais fermentativo a *S. cerevisiae* consegue manter uma taxa de divisão celular constante. Apesar da eficiência energética da fermentação ser bastante inferior, a célula tem a capacidade de manter fluxos glicolíticos muito mais elevados do que a respiração, podendo, talvez, compensar a baixa eficiência energética [12]. Aumentando o fluxo glicolítico a célula poderá conseguir satisfazer a demanda por ATP necessário para as exigências energéticas dos processos celulares de manutenção e divisão celulares.

Futuramente uma tarefa a ser desenvolvida consiste na optimização do calorímetro usado neste trabalho para permitir o estudo da fase pós-diáuxica pois o sistema actual não permite uma oxigenação

suficiente no bioreactor para o crescimento aeróbio e, possivelmente, a depleção do O₂ no circuito calorimétrico faz com que o metabolismo medido na célula calorimétrica seja diferente do metabolismo das células no bioreactor. Todas as tentativas de obter uma curva calorimétrica do crescimento da *S. cerevisiae* em substratos respiratórios fracassaram pelas razões anteriores.

Interessantemente o perfil calorimétrico da *S. cerevisiae* altera-se perante uma situação de fome associada a um nutriente auxotrófico, contudo não perante a fome associada a inositol. Isto implica que a remodelação metabólica orquestrada pela célula de forma a suportar uma situação de fome é muito mais intensa para as auxotrofias. Estes resultados reforçam que a *S. cerevisiae* BY4741 tem uma dificuldade intrínseca de responder a situações de fome não naturais, derivadas de auxotrofias, que não se observa para nutrientes que a célula consegue sintetizar [29] [23]. Seria interessante, num futuro próximo explorar a situação de fome induzida para outros nutrientes “naturais” e auxotróficos a fim de comparar os efeitos metabólicos de cada tipo de fome, através de calorimetria.

Em face dos presentes resultados, é evidente que a investigação das fases estacionária e exponencial tardia deve ser realizada com cautela, uma vez que as células poderão apresentar uma resposta devida, não ao efeito que se está a estudar, mas sim à fome de aminoácidos auxotróficos ou em resposta à fome mais estímulo (sinergismo). Esta situação poderá justificar em parte a baixa sobrevivência da BY4741 na fase estacionária em meio SC, descrita na literatura [28]. É importante ter em consideração a influência que o meio de cultura usado pode ter nos resultados obtidos, sobretudo quando se usam estirpes auxotróficas, mais sensíveis a variações na constituição do meio. Este efeito poderá, inclusivé, justificar diferenças observadas numa resposta a determinado estímulo entre diferentes estirpes.

O rendimento em biomassa determinado para a estirpe BY4741 revelou um padrão não uniforme, com uma maior rendimento no início da exponencial, diminuindo para cerca de metade na exponencial mais tardia. Contudo, o rendimento em biomassa deverá diminuir continuamente ao longo da exponencial, descrevendo um comportamento idêntico ao da entalpia de metabolização da glucose. Isto deverá acontecer pois o calor libertado por biomassa formada é constante ao longo de todo o crescimento, o que significa que a biomassa descreve o mesmo comportamento do calor em função da concentração de glucose, ou seja, da entalpia de metabolização da glucose. O rendimento em biomassa, desta forma, tende a diminuir ao longo da fase exponencial, acompanhando a diminuição do metabolismo respiratório (ao qual está associado um rendimento em biomassa muito superior ao fermentativo).

Já foram realizados muitos estudos sobre os efeitos do H₂O₂ em doses letais, contudo, tanto quanto se sabe, em nenhum foi observado o padrão de morte bifásico descrito neste trabalho. Isto acontece porque os ensaios de viabilidade ao longo do tempo não são, regra geral, feitos com a duração necessária para se observar este fenómeno. Os resultados desta Tese indicam que após a exposição a uma dose letal de H₂O₂ a *S. cerevisiae* apresenta duas fases de adaptação completamente distintas: uma primeira fase

de morte celular, onde as células ainda não estão adaptadas e morrem a uma taxa elevada; e numa segunda fase, onde as células conseguem adaptar-se, conseguindo condições que lhes permite sobreviver ao elevado *stress* oxidativo (por exemplo, através da formação de um gradiente de H_2O_2 favorável [63]), contudo ainda sem capacidade proliferativa na presença de H_2O_2 . Durante a primeira fase há uma diminuição das áreas de colónias a crescer em placa. Assumindo que cada colónia é originada de uma única célula, e que a taxa de crescimento é constante entre diferentes colónias, então a área de uma colónia é o reflexo do tempo que a primeira célula dessa colónia demorou a retomar o crescimento exponencial. Uma colónia com área grande significa que a primeira célula retomou mais rapidamente o crescimento exponencial do que a primeira célula de uma colónia mais pequena. Portanto, durante a primeira fase da cinética de morte, o tempo necessário para que as células retomem o crescimento exponencial (em placa) tende a aumentar, consistente com um acumular de danos celulares causados pelo *stress* oxidativo. Ao longo da segunda fase o comportamento é o inverso, havendo uma diminuição do tempo necessário para se iniciar a proliferação celular, sugerindo que esta fase é sobretudo de reparação dos danos causados durante a primeira fase. Assumindo esta hipótese, apenas quando todas as células da população terminam as reparações dos danos causados é que tem início a divisão celular, de uma forma aparentemente sincronizada. Futuramente, de forma a poder testar a hipótese de o atraso em retomar o crescimento exponencial é consequência do tempo despendido pela célula na reparação de danos, poder-se-ia fazer uma eletroforese *comet assay* que deteta o DNA fragmentado e desta forma comprovar se, de facto, durante a primeira fase do perfil de morte há um acumular de danos celulares (neste caso ao nível do DNA) que são reparados durante a segunda fase.

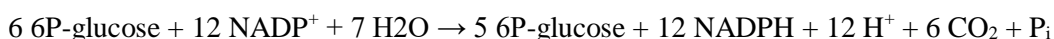
É geralmente conhecido e aceite que a adaptação celular a doses subletais de H_2O_2 , faz aumentar a resistência das células a um *stress* subsequente maior [64] [66] [67]. Neste trabalho observou-se que a adaptação a doses subletais de H_2O_2 reduz a morte celular após exposição a uma dose letal de H_2O_2 , diminuindo a duração da primeira fase (fase de morte celular). Isto significa que os típicos protocolos de adaptação celular a doses subletais de H_2O_2 permitem às células adaptarem-se mais rapidamente quando expostas a uma dose letal. Ao aumento de resistência está associada a uma diminuição da permeabilidade membranar ao H_2O_2 e o aumento da atividade dos enzimas antioxidantes. Uma hipótese é que a adaptação celular faz aumentar os níveis de enzimas antioxidantes e diminuir a permeabilidade da membrana, não o suficiente para resistir ao elevado *stress*, mas aproximando os níveis basais de um limiar para o qual a célula passa a ser resistente ao *stress*, resultando portanto numa diminuição do tempo necessário para as células se adaptarem a uma dose letal de H_2O_2 . Esta hipótese é consistente com células adaptadas e não adaptadas apresentarem o mesmo perfil bifásico de morte, com a mesma taxa de morte na primeira fase (implicando que têm a mesma suscetibilidade ao H_2O_2), diferindo apenas na duração desta.

Curiosamente, o protocolo de adaptação celular ao H_2O_2 revelou-se ineficiente em mutantes deletados para o enzima G6PDH, isto é, mutantes cuja via PPP é afetada e a produção de NADPH está

severamente comprometida. Estes resultados vêm reforçar o papel central que a via PPP desempenha na adaptação celular ao H_2O_2 , que já tinha sido descrito em [57]. Contudo, o perfil de morte celular destes mutantes apresenta uma segunda fase extremamente resistente ao H_2O_2 , ao contrário do que seria de esperar, sendo que a deleção do gene *ZWF1* encontra-se normalmente associada a um aumento de suscetibilidade ao H_2O_2 [57]. Possivelmente, este aumento de resistência nunca tinha sido observado anteriormente pois os ensaios de sobrevivência são efetuados muitas vezes em tampão, não possibilitando à célula qualquer tipo de adaptação dependente da síntese *de novo* de componentes celulares, enquanto neste trabalho o ensaio foi realizado em meio de cultura. Além disso, as células *ZWF1Δ* apresentam uma incapacidade de retomar o crescimento exponencial na presença de H_2O_2 , ao contrário da estirpe *wt*, reforçando os dados na literatura [70] [113] [114] e, indicando que a via PPP é essencial para a manutenção e proliferação celulares em situações de elevado *stress* oxidativo. No futuro, um possível estudo para testar se o aumento da resistência ao *stress* oxidativo em células com a via PPP diminuída é um evento autêntico ou se é consequência de adaptações celulares resultantes do *knockout*, poderá ser feito através de um *knockdown* do gene *ZWF1*. Seria ainda interessante identificar quais as alterações (se existirem) ao perfil de morte de outros mutantes, como os mutantes de catalase, de GSH, de GPx, entre outros, e desta forma perceber melhor o papel de cada um destes agentes da resposta antioxidante na adaptação celular ao *stress* oxidativo.

A resposta calorimétrica imediata a uma adição de H_2O_2 apresentou um efeito de hormese. Para a concentração 150 μM de H_2O_2 , observou-se um aumento da P dissipada pela população que deverá estar associada à atividade enzimática antioxidante. Para as restantes concentrações de H_2O_2 observou-se uma diminuição da P dissipada, consistente com a morte celular. Tendo em conta que as células após a exposição a uma dose letal de H_2O_2 vão morrendo de uma forma progressiva seguindo um decaimento exponencial e não de uma forma instantânea, então a diminuição abrupta da P dissipada não pode ser apenas uma consequência do menor número de células que resulta da morte celular. Na exposição a doses letais de H_2O_2 , além da morte celular que se observa e que contribui para a diminuição da P dissipada pela população, deverá haver também uma diminuição da potência por célula, consistente com uma alteração no metabolismo principal da célula. De facto está documentado que na exposição a H_2O_2 ocorre a inibição da glicólise [70] [119] e do ciclo TCA [12] [70] [119] [120], simultaneamente com indução da via PPP [70] [119], originando um reencaminhamento dos recursos da glicólise para a PPP, com o objetivo de aumentar a produção de NADPH que é essencial à resposta antioxidante. Foi demonstrado, em levedura [118] e em queratinócitos humanos [120], que o redirecionamento do fluxo glicolítico para a PPP ocorre segundos após a exposição ao H_2O_2 . Portanto, a diminuição da P observada em culturas de *S. cerevisiae* imediatamente após exposição a uma dose letal de H_2O_2 pode ser explicada pela alteração do metabolismo para a via PPP, caso a entalpia associada a esta via seja inferior à fermentação ou alternativamente se tiver um fluxo bastante inferior ao fluxo glicolítico. O fluxo de 6P-glucose através da PPP origina, além de NADPH, 5P-ribose que é convertido no ramo não-oxidativo da

PPP em 6P-frutose e 3P-gliceraldeído, ambos metabolitos da via glicolítica, que podem ser reciclados novamente em 6P-glucose através da via gluconeogénica, obtendo-se, a seguinte estequiometria para a PPP [121]:



Assumindo os valores de entalpias de formação dos vários metabolitos [122], chega-se a um valor de $+45.3 \text{ kJ mol}^{-1}_{\text{6P-glucose}}$ para a entalpia da via PPP. Face a este valor, de sinal oposto ao da glicólise ($-97.2 \text{ kJ mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ou $-74.5 \text{ kJ mol}^{-1}_{\text{6P-glucose}}$ se se assumir o 6P-glucose como o primeiro metabolito da via), parece lógico que o redireccionamento do fluxo glicolítico para a PPP provoque uma diminuição acentuada na P dissipada pela população.

Noutro trabalho [83], não foi encontrada diferença entre o calor libertado por culturas de *S. cerevisiae* expostas a $150 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário até ao primeiro máximo, relativamente a culturas não expostas a H_2O_2 (controlo). Nesta Tese observou-se um aumento do calor dissipado até ao primeiro máximo da curva calorimétrica por culturas de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC expostas a três adições *bolus* de H_2O_2 . Isto sugere que a exposição subletal do H_2O_2 a *S. cerevisiae* é mais “suave” através do método do estado estacionário, pois o conjunto das três adições representou uma dose de $450 \mu\text{M}$, enquanto na adição em estado estacionário, um total de $550 \mu\text{M}$ foram adicionados. Curiosamente, as 3 adições *bolus* apenas fizeram aumentar o calor dissipado até ao primeiro máximo das curvas calorimétricas, enquanto o valor no segundo máximo ou na fase estacionário permaneceu inalterado entre culturas expostas a H_2O_2 e controlo. Esta diferença observada no primeiro máximo poderá estar relacionada com um efeito de sinergismo entre *stress* oxidativo e fome de metionina, pois esta diferença perde-se quando se elimina a fome de metionina. De facto já anteriormente foi reportada uma relação entre a fome de metionina em estirpes auxotróficas e a resposta ao *stress* oxidativo [30]. Uma possível explicação para a diferença de resultados entre estado estacionário e as 3 adições *bolus* poderá estar associada aos picos de concentração de H_2O_2 após cada adição *bolus*, que se verificou serem superiores a $150 \mu\text{M}$ (dados não apresentados) para a segunda e terceira adições, enquanto o estado estacionário apresenta uma concentração aproximadamente constante de $150 \mu\text{M}$, originando respostas diferentes.

Concluindo, a elevada sensibilidade das medidas calorimétricas pode fornecer importantes dados em relação aos perfis metabólicos das células, contribuindo para uma melhor compreensão de como as células utilizam os nutrientes disponíveis para o crescimento exponencial ou para a manutenção em condições de *stress*.

6. Bibliografia

- [1] L. Váchová, M. Čáp, e Z. Palková, «Yeast Colonies: A Model for Studies of Aging, Environmental Adaptation, and Longevity», *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, pp. 1–8, 2012.
- [2] S. Ostergaard, L. Olsson, e J. Nielsen, «Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, n. 1, pp. 34–50, Mar. 2000.
- [3] D. Botstein e G. R. Fink, «Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology», *Genetics*, vol. 189, n. 3, pp. 695–704, Nov. 2011.
- [4] J. I. Castrillo e S. G. Oliver, «Yeast systems biology: the challenge of eukaryotic complexity», *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 759, pp. 3–28, 2011.
- [5] H. Feldmann, *Yeast: molecular and cell biology*, Second edition. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2012.
- [6] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, e S. G. Oliver, «Life with 6000 genes», *Science*, vol. 274, n. 5287, pp. 546, 563–567, Out. 1996.
- [7] C. B. Brachmann, A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, e J. D. Boeke, «Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 14, n. 2, pp. 115–132, Jan. 1998.
- [8] W.-K. Huh, J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman, e E. K. O'Shea, «Global analysis of protein localization in budding yeast», *Nature*, vol. 425, n. 6959, pp. 686–691, Out. 2003.
- [9] J. R. S. Newman, S. Ghaemmaghami, J. Ihmels, D. K. Breslow, M. Noble, J. L. DeRisi, e J. S. Weissman, «Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise», *Nature*, vol. 441, n. 7095, pp. 840–846, Jun. 2006.
- [10] S. Ghaemmaghami, W.-K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea, e J. S. Weissman, «Global analysis of protein expression in yeast», *Nature*, vol. 425, n. 6959, pp. 737–741, Out. 2003.
- [11] R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, e A. Devin, «The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1807, n. 6, pp. 568–576, Jun. 2011.
- [12] N. Slavov, B. A. Budnik, D. Schwab, E. M. Airoidi, e A. van Oudenaarden, «Constant Growth Rate Can Be Supported by Decreasing Energy Flux and Increasing Aerobic Glycolysis», *Cell Rep.*, vol. 7, n. 3, pp. 705–714, Mai. 2014.
- [13] O. Warburg, «On the origin of cancer cells», *Science*, vol. 123, n. 3191, pp. 309–314, Fev. 1956.
- [14] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, e C. B. Thompson, «Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation», *Science*, vol. 324, n. 5930, pp. 1029–1033, Mai. 2009.
- [15] N. Slavov e D. Botstein, «Decoupling nutrient signaling from growth rate causes aerobic glycolysis and deregulation of cell size and gene expression», *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, n. 2, pp. 157–168, Jan. 2013.
- [16] J. V. Gray, G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer, e M. Werner-Washburne, «“Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, n. 2, pp. 187–206, Jun. 2004.
- [17] A. Schiraldi, «Microbial growth and metabolism: Modelling and calorimetric characterization», *Pure Appl. Chem.*, vol. 67, n. 11, Jan. 1995.
- [18] G. M. Walker, *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester ; New York: J. Wiley & Sons, 1998.
- [19] J. Brejning e L. Jespersen, «Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*», *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 75, n. 1–2, pp. 27–38, Mai. 2002.
- [20] M. D. Rolfe, C. J. Rice, S. Lucchini, C. Pin, A. Thompson, A. D. S. Cameron, M. Alston, M. F. Stringer, R. P. Betts, J. Baranyi, M. W. Peck, e J. C. D. Hinton, «Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That

- Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation», *J. Bacteriol.*, vol. 194, n. 3, pp. 686–701, Fev. 2012.
- [21] M. Radonjic, J.-C. Andrau, P. Lijnzaad, P. Kemmeren, T. T. J. P. Kockelkorn, D. van Leenen, N. L. van Berkum, e F. C. P. Holstege, «Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon *S. cerevisiae* Stationary Phase Exit», *Mol. Cell*, vol. 18, n. 2, pp. 171–183, Abr. 2005.
- [22] M. J. Brauer, C. Huttenhower, E. M. Airolidi, R. Rosenstein, J. C. Matese, D. Gresham, V. M. Boer, O. G. Troyanskaya, e D. Botstein, «Coordination of Growth Rate, Cell Cycle, Stress Response, and Metabolic Activity in Yeast», *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, n. 1, pp. 352–367, Jan. 2008.
- [23] M. J. Brauer, A. J. Saldanha, K. Dolinski, e D. Botstein, «Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures», *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, n. 5, pp. 2503–2517, Mai. 2005.
- [24] J. R. Broach, «Nutritional Control of Growth and Development in Yeast», *Genetics*, vol. 192, n. 1, pp. 73–105, Set. 2012.
- [25] B. Hahn-Hägerdal, K. Karhumaa, C. U. Larsson, M. Gorwa-Grauslund, J. Görgens, e W. H. van Zyl, «Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use», *Microb. Cell Factories*, vol. 4, p. 31, 2005.
- [26] D. C. la Grange, I. S. Pretorius, e W. H. van Zyl, «Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*.», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n. 3, pp. 1036–1044, Mar. 1996.
- [27] A. M. James, *Thermal and energetic studies of cellular biological systems*. Bristol: Wright, 1987.
- [28] M. Hanscho, D. E. Ruckerbauer, N. Chauhan, H. F. Hofbauer, S. Krahulec, B. Nidetzky, S. D. Kohlwein, J. Zanghellini, e K. Natter, «Nutritional requirements of the BY series of *Saccharomyces cerevisiae* strains for optimum growth», *FEMS Yeast Res.*, vol. 12, n. 7, pp. 796–808, Nov. 2012.
- [29] A. J. Saldanha, M. J. Brauer, e D. Botstein, «Nutritional Homeostasis in Batch and Steady-State Culture of Yeast», *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, n. 9, pp. 4089–4104, Set. 2004.
- [30] A. A. Petti, C. A. Crutchfield, J. D. Rabinowitz, e D. Botstein, «Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n. 45, pp. E1089–E1098, Nov. 2011.
- [31] M. Tsukada e Y. Ohsumi, «Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*», *FEBS Lett.*, vol. 333, n. 1–2, pp. 169–174, Out. 1993.
- [32] U. von Stockar e I. W. Marison, «The use of calorimetry in biotechnology», em *Bioprocesses and Engineering*, vol. 40, Springer Berlin Heidelberg, 1989, pp. 93–136.
- [33] T. Maskow, R. Kemp, F. Buchholz, T. Schubert, B. Kiesel, e H. Harms, «What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: from chip- to megacalorimetry», *Microb. Biotechnol.*, vol. 3, n. 3, pp. 269–284, Mai. 2010.
- [34] I. Lamprecht, «Calorimetry and thermodynamics of living systems», *Thermochim. Acta*, vol. 405, n. 1, pp. 1–13, Out. 2003.
- [35] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, e A. U. Daniels, «Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 303, n. 1, pp. 1–8, Fev. 2010.
- [36] C. Larsson, A. Blomberg, e L. Gustafson, «Use of microcalorimetric monitoring in establishing continuous energy balances and in continuous determinations of substrate and product concentrations of batch-grown *Saccharomyces cerevisiae*», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 38, n. 5, pp. 447–458, Ago. 1991.
- [37] A. Lavoisier e P. Laplace, *Histoire de l'Académie des Sciences, Année 1780*. 1784.
- [38] M. Dubrunfaut, em *Note sur al chaleur et le travail mecanique produits lar la fermentation vineuse*, vol. 42, Paris: C R Acad Sci., 1856, pp. 945–948.
- [39] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, e A. U. Daniels, «Biomedical Use of Isothermal Microcalorimeters», *Sensors*, vol. 10, n. 10, pp. 9369–9383, Out. 2010.
- [40] J. A. M. Simoes e M. M. Da Piedade, *Molecular Energetics: Condensed-Phase Thermochemical Techniques*. Oxford: Oxford University Press, USA, 2008.

- [41] M. D. Temple, G. G. Perrone, e I. W. Dawes, «Complex cellular responses to reactive oxygen species», *Trends Cell Biol.*, vol. 15, n. 6, pp. 319–326, Jun. 2005.
- [42] S. G. Rhee, «H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling», *Science*, vol. 312, n. 5782, pp. 1882–1883, Jun. 2006.
- [43] B. L. Trumpower, «The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex», *J. Biol. Chem.*, vol. 265, n. 20, pp. 11409–11412, Jul. 1990.
- [44] M. P. Murphy, «How mitochondria produce reactive oxygen species», *Biochem. J.*, vol. 417, n. Pt 1, pp. 1–13, Jan. 2009.
- [45] A. Boveris, E. Cadenas, e A. O. Stoppani, «Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide», *Biochem. J.*, vol. 156, n. 2, pp. 435–444, Mai. 1976.
- [46] K. M. Holmström e T. Finkel, «Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, n. 6, pp. 411–421, Jun. 2014.
- [47] A. Boveris e B. Chance, «The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen», *Biochem. J.*, vol. 134, n. 3, pp. 707–716, Jul. 1973.
- [48] S. Raha e B. H. Robinson, «Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis», *Am. J. Med. Genet.*, vol. 106, n. 1, pp. 62–70, 2001.
- [49] H. J. Forman, «Redox signaling: an evolution from free radicals to aging», *Free Radic. Biol. Med.*, Jul. 2016.
- [50] H. J. Forman e A. Azzi, «On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology», *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 11, n. 5, pp. 374–375, Abr. 1997.
- [51] E. A. Veal, A. M. Day, e B. A. Morgan, «Hydrogen peroxide sensing and signaling», *Mol. Cell*, vol. 26, n. 1, pp. 1–14, Abr. 2007.
- [52] A. Cozzi, B. Corsi, S. Levi, P. Santambrogio, A. Albertini, e P. Arosio, «Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity», *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n. 33, pp. 25122–25129, Ago. 2000.
- [53] M. P. Seldon, G. Silva, N. Pejanovic, R. Larsen, I. P. Gregoire, J. Filipe, J. Anrather, e M. P. Soares, «Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n. 11, pp. 7840–7851, Dez. 2007.
- [54] M. Ristow, «Unraveling the Truth About Antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits», *Nat. Med.*, vol. 20, n. 7, pp. 709–711, Jul. 2014.
- [55] C. Godon, G. Lagniel, J. Lee, J. M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M. B. Toledano, e J. Labarre, «The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n. 35, pp. 22480–22489, Ago. 1998.
- [56] S. Izawa, Y. Inoue, e A. Kimura, «Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*.», *Biochem. J.*, vol. 320, n. Pt 1, pp. 61–67, Nov. 1996.
- [57] S. Izawa, K. Maeda, T. Miki, J. Mano, Y. Inoue, e A. Kimura, «Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*.», *Biochem. J.*, vol. 330, n. Pt 2, pp. 811–817, Mar. 1998.
- [58] S. Izawa, Y. Inoue, e A. Kimura, «Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*», *FEBS Lett.*, vol. 368, n. 1, pp. 73–76, Jul. 1995.
- [59] D. D. Gutterman, «Mitochondria and reactive oxygen species: an evolution in function», *Circ. Res.*, vol. 97, n. 4, pp. 302–304, Ago. 2005.
- [60] T. Nguyen, P. Nioi, e C. B. Pickett, «The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n. 20, pp. 13291–13295, Mai. 2009.
- [61] M. Breker, M. Gymrek, e M. Schuldiner, «A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses», *J. Cell Biol.*, vol. 200, n. 6, pp. 839–850, Mar. 2013.

- [62] D. Martins e A. M. English, «Catalase activity is stimulated by H_2O_2 in rich culture medium and is required for H_2O_2 resistance and adaptation in yeast», *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 308–313, Jan. 2014.
- [63] M. R. Branco, H. S. Marinho, L. Cyrne, e F. Antunes, «Decrease of H_2O_2 plasma membrane permeability during adaptation to H_2O_2 in *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n. 8, pp. 6501–6506, Fev. 2004.
- [64] Q. Zhang, J. Pi, C. G. Woods, A. M. Jarabek, H. J. Clewell, e M. E. Andersen, «Hormesis and Adaptive Cellular Control Systems», *Dose-Response*, vol. 6, n. 2, pp. 196–208, Mar. 2008.
- [65] E. J. Calabrese e L. A. Baldwin, «Defining hormesis», *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 21, n. 2, pp. 91–97, Fev. 2002.
- [66] J. M. Davies, C. V. Lowry, e K. J. Davies, «Transient adaptation to oxidative stress in yeast», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 317, n. 1, pp. 1–6, Fev. 1995.
- [67] H. M. Semchyshyn, «Hormetic concentrations of hydrogen peroxide but not ethanol induce cross-adaptation to different stresses in budding yeast», *Int. J. Microbiol.*, vol. 2014, p. 485792, 2014.
- [68] A. Mesquita, M. Weinberger, A. Silva, B. Sampaio-Marques, B. Almeida, C. Leão, V. Costa, F. Rodrigues, W. C. Burhans, e P. Ludovico, «Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H_2O_2 and superoxide dismutase activity», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n. 34, pp. 15123–15128, Ago. 2010.
- [69] P. Ludovico e W. C. Burhans, «Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police», *FEMS Yeast Res.*, vol. 14, n. 1, pp. 33–39, Fev. 2014.
- [70] K. I. Minard e L. McAlister-Henn, «Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, n. 6, pp. 832–843, Set. 2001.
- [71] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, e M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013.
- [72] H. S. Marinho, L. Cyrne, E. Cadenas, e F. Antunes, « H_2O_2 delivery to cells: steady-state versus bolus addition», *Methods Enzymol.*, vol. 526, pp. 159–173, 2013.
- [73] V. de Oliveira-Marques, L. Cyrne, H. S. Marinho, e F. Antunes, «A Quantitative Study of NF- κ B Activation by H_2O_2 : Relevance in Inflammation and Synergy with TNF- α », *J. Immunol.*, vol. 178, n. 6, pp. 3893–3902, Mar. 2007.
- [74] A. C. Matias, H. S. Marinho, L. Cyrne, E. Herrero, e F. Antunes, «Biphasic modulation of fatty acid synthase by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 515, n. 1–2, pp. 107–111, Nov. 2011.
- [75] A. Barbouti, P.-T. Doulias, L. Nosis, M. Tenopoulou, e D. Galaris, «DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H_2O_2 », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 33, n. 5, pp. 691–702, Set. 2002.
- [76] M. Leskiv, C. E. S. Bernardes, e M. E. M. da Piedade, «A calorimetric system based on the LKB 10700-1 flow microcalorimeter», *Meas. Sci. Technol.*, vol. 20, n. 7, p. 75107, 2009.
- [77] A. Garedew, E. Schmolz, e I. Lamprecht, «Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods», *Thermochim. Acta*, vol. 415, n. 1–2, pp. 99–106, Jun. 2004.
- [78] C. E. S. Bernardes, *CBCAL 1.0: A program for calorimeter control and data acquisition*. Lisbon: FCUL, 2008.
- [79] M. A. A. O'Neill, A. E. Beezer, C. Labetoulle, L. Nicolaides, J. C. Mitchell, J. A. Orchard, J. A. Connor, R. B. Kemp, e D. Olomolaiye, «The base catalysed hydrolysis of methyl paraben: a test reaction for flow microcalorimeters used for determination of both kinetic and thermodynamic parameters», *Thermochim. Acta*, vol. 399, n. 1–2, pp. 63–71, Mar. 2003.
- [80] R. N. Bento, M. A. Rendas, V. A. R. Semedo, C. E. S. Bernardes, M. S. C. S. Santos, H. P. Diogo, F. Antunes, e M. E. Minas da Piedade, «The standard molar enthalpy of the base catalysed hydrolysis of methyl paraben revisited», *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 103, pp. 176–180, Set. 2016.
- [81] A. Garedew, M. Feist, E. Schmolz, e I. Lamprecht, «Thermal analysis of mumiyo, the legendary folk remedy from the Himalaya region», *Thermochim. Acta*, vol. 417, n. 2, pp. 301–309, Jul. 2004.

- [82] M. a. A. O'Neill, S. Gaisford, A. E. Beezer, C. V. Skaria, e P. Sears, «A comparison of the performance of calorimeters», *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 84, n. 2, pp. 301–306, Abr. 2006.
- [83] R. N. Bento, «Estudo em tempo real e in vivo da regulação do metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* pelo H_2O_2 », Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisbon, 2015.
- [84] P. Thomas, A. C. Sekhar, R. Upreti, M. M. Mujawar, e S. S. Pasha, «Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples», *Biotechnol. Rep.*, vol. 8, pp. 45–55, Dez. 2015.
- [85] E. M. Gonçalves, A. Joseph, A. C. L. Conceição, e M. E. Minas da Piedade, «Potentiometric Titration Study of the Temperature and Ionic Strength Dependence of the Acidity Constants of Nicotinic Acid (Niacin)», *J. Chem. Eng. Data*, vol. 56, n. 6, pp. 2964–2970, Jun. 2011.
- [86] C. A. Schneider, W. S. Rasband, e K. W. Eliceiri, «NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis», *Nat. Methods*, vol. 9, n. 7, pp. 671–675, Jun. 2012.
- [87] B. Birou, I. W. Marison, e U. V. Stockar, «Calorimetric investigation of aerobic fermentations», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 30, n. 5, pp. 650–660, Out. 1987.
- [88] B. Sonnleitner e O. Käppeli, «Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 28, n. 6, pp. 927–937, Jun. 1986.
- [89] U. von Stockar e B. Birou, «The heat generated by yeast cultures with a mixed metabolism in the transition between respiration and fermentation», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 34, n. 1, pp. 86–101, Jun. 1989.
- [90] R. Cohen e D. Engelberg, «Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 273, n. 2, pp. 239–243, Ago. 2007.
- [91] I. Corbacho, F. Teixedó, R. Velázquez, L. M. Hernández, e I. Olivero, «Standard YPD, even supplemented with extra nutrients, does not always compensate growth defects of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic strains», *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 99, n. 3, pp. 591–600, Mar. 2011.
- [92] P. M. Bruinenberg, J. P. Van Dijken, e W. A. Scheffers, «A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts», *Microbiology*, vol. 129, n. 4, pp. 953–964, 1983.
- [93] I. Nookaew, M. C. Jewett, A. Meechai, C. Thammarongtham, K. Laoteng, S. Cheevadhanarak, J. Nielsen, e S. Bhumiratana, «The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism», *BMC Syst. Biol.*, vol. 2, p. 71, Ago. 2008.
- [94] F. Reggiori e D. J. Klionsky, «Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation», *Genetics*, vol. 194, n. 2, pp. 341–361, Jun. 2013.
- [95] M. F. Tuite e S. G. Oliver, *Saccharomyces*. Boston, MA: Springer US, 1991.
- [96] R. M. Atlas, *Handbook of microbiological media*, 4. ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2010.
- [97] M. L. Gaspar, H. F. Hofbauer, S. D. Kohlwein, e S. A. Henry, «Coordination of storage lipid synthesis and membrane biogenesis: evidence for cross-talk between triacylglycerol metabolism and phosphatidylinositol synthesis», *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n. 3, pp. 1696–1708, Jan. 2011.
- [98] N. Bonander e R. M. Bill, «Optimising yeast as a host for recombinant protein production (review)», *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 866, pp. 1–9, 2012.
- [99] S. A. Henry, M. L. Gaspar, e S. A. Jesch, «The response to inositol: Regulation of glycerolipid metabolism and stress response signaling in yeast», *Chem. Phys. Lipids*, vol. 180, pp. 23–43, Mai. 2014.
- [100] B. Cerulus, A. M. New, K. Pougach, e K. J. Verstrepen, «Noise and Epigenetic Inheritance of Single-Cell Division Times Influence Population Fitness», *Curr. Biol. CB*, vol. 26, n. 9, pp. 1138–1147, Mai. 2016.
- [101] L. Paciello, J. Zueco, e C. Landi, «On the fermentative behavior of auxotrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae*», *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 17, n. 5, pp. 246–249, Set. 2014.

- [102] R. B. Kemp, *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: From Macromolecules to Man*. Elsevier, 1999.
- [103] E. H. Battley, «A reevaluation of the thermodynamics of growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose, ethanol, and acetic acid», *Can. J. Microbiol.*, vol. 41, n. 4–5, pp. 388–398, Abr. 1995.
- [104] P. K. Gallagher, M. E. Brown, e R. B. Kemp, *Handbook of thermal analysis and calorimetry*. Amsterdam [Netherlands] ; New York: Elsevier, 1998.
- [105] L. Auberson e U. Vonstockar, «The role of the limited respiratory capacity in the *Saccharomyces cerevisiae* whi2 mutation», *J. Biotechnol.*, vol. 23, n. 1, pp. 35–53, Mar. 1992.
- [106] Y. Zhao, D. Yan, J. Wang, P. Zhang, e X. Xiao, «Anti-fungal effect of berberine on *Candida albicans* by microcalorimetry with correspondence analysis», *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 102, n. 1, pp. 49–55, Nov. 2009.
- [107] J. B. Russell, «Heat production by ruminal bacteria in continuous culture and its relationship to maintenance energy.», *J. Bacteriol.*, vol. 168, n. 2, pp. 694–701, Nov. 1986.
- [108] D. P. Nelson e L. A. Kiesow, «Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV)», *Anal. Biochem.*, vol. 49, n. 2, pp. 474–478, Out. 1972.
- [109] R. Prabhakar, T. Vreven, K. Morokuma, e D. G. Musaev, «Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: a density functional study», *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 44, n. 35, pp. 11864–11871, Set. 2005.
- [110] B. Demple e J. Halbrook, «Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*», *Nature*, vol. 304, n. 5925, pp. 466–468, Ago. 1983.
- [111] M. F. Christman, R. W. Morgan, F. S. Jacobson, e B. N. Ames, «Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*», *Cell*, vol. 41, n. 3, pp. 753–762, Jul. 1985.
- [112] K. Lewis, «Persister Cells», *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 64, n. 1, pp. 357–372, 2010.
- [113] I. Nogae e M. Johnston, «Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase», *Gene*, vol. 96, n. 2, pp. 161–169, Dez. 1990.
- [114] D. Thomas, H. Cherest, e Y. Surdin-Kerjan, «Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur», *EMBO J.*, vol. 10, n. 3, pp. 547–553, Mar. 1991.
- [115] C. Leroy, C. Mann, e M.-C. Marsolier, «Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions», *EMBO J.*, vol. 20, n. 11, pp. 2896–2906, Jun. 2001.
- [116] K. Finn, N. F. Lowndes, e M. Grenon, «Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, n. 9, pp. 1447–1473, Nov. 2011.
- [117] J. A. Flattery-O'Brien e I. W. Dawes, «Hydrogen Peroxide Causes RAD9-dependent Cell Cycle Arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas Menadione Causes G1 Arrest Independent of RAD9 Function», *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n. 15, pp. 8564–8571, Out. 1998.
- [118] M. Ralser, M. M. Wamelink, A. Kowald, B. Gerisch, G. Heeren, E. A. Struys, E. Klipp, C. Jakobs, M. Breitenbach, H. Lehrach, e S. Krobitsch, «Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress», *J. Biol.*, vol. 6, n. 4, p. 10, 2007.
- [119] L. Tretter e V. Adam-Vizi, «Inhibition of Krebs Cycle Enzymes by Hydrogen Peroxide: A Key Role of α -Ketoglutarate Dehydrogenase in Limiting NADH Production under Oxidative Stress», *J. Neurosci.*, vol. 20, n. 24, pp. 8972–8979, Dez. 2000.
- [120] A. Kuehne, H. Emmert, J. Soehle, M. Winnefeld, F. Fischer, H. Wenck, S. Gallinat, L. Terstegen, R. Lucius, J. Hildebrand, e N. Zamboni, «Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells», *Mol. Cell*, vol. 59, n. 3, pp. 359–371, Ago. 2015.
- [121] T. P. Dick e M. Ralser, «Metabolic Remodeling in Times of Stress: Who Shoots Faster than His Shadow?», *Mol. Cell*, vol. 59, n. 4, pp. 519–521, Ago. 2015.

- [122] R. A. Alberty, «Calculation of standard transformed formation properties of biochemical reactants and standard apparent reduction potentials of half reactions», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 358, n. 1, pp. 25–39, Out. 1998.

7. Material suplementar

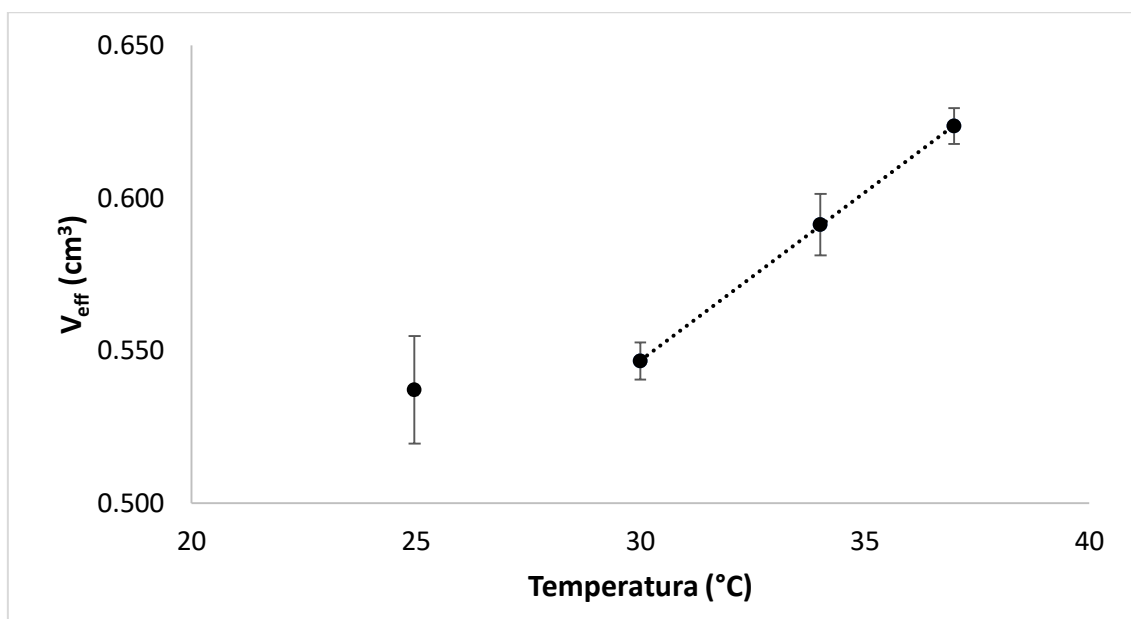


Figura S1 – Variação do volume efetivo da célula calorimétrica do LKB10700-1 usado neste trabalho com a temperatura. O volume efetivo foi determinado a partir da reação de hidrólise básica de MP, tal como em [79] (para mais detalhes ver secção 3.4). As barras de erro representam o desvio padrão de n experiências independentes ($n \geq 5$).

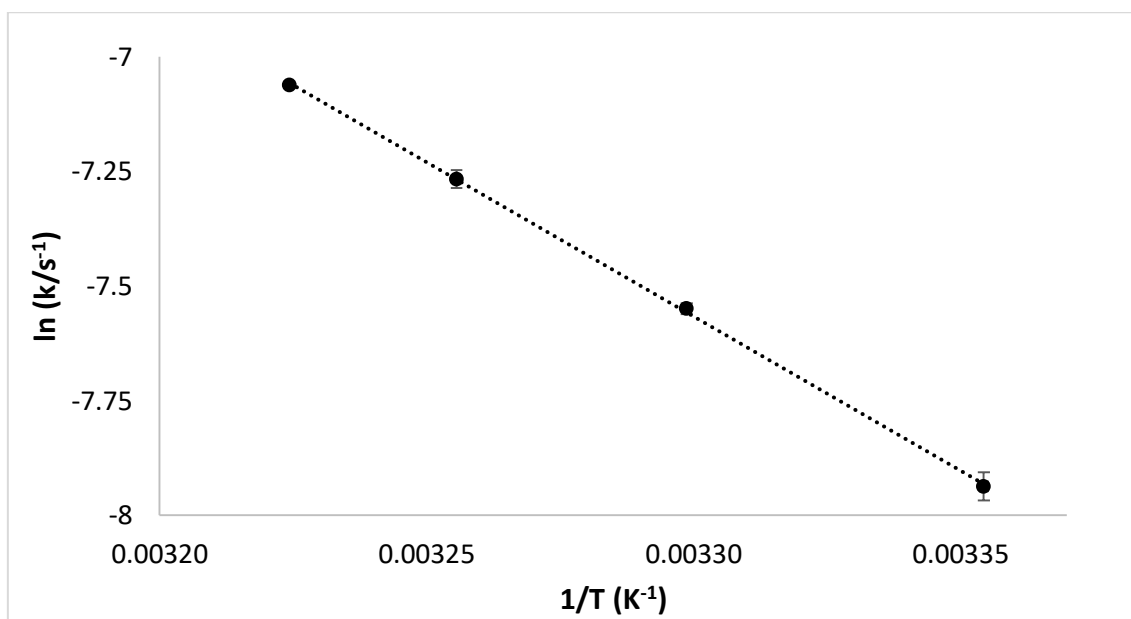
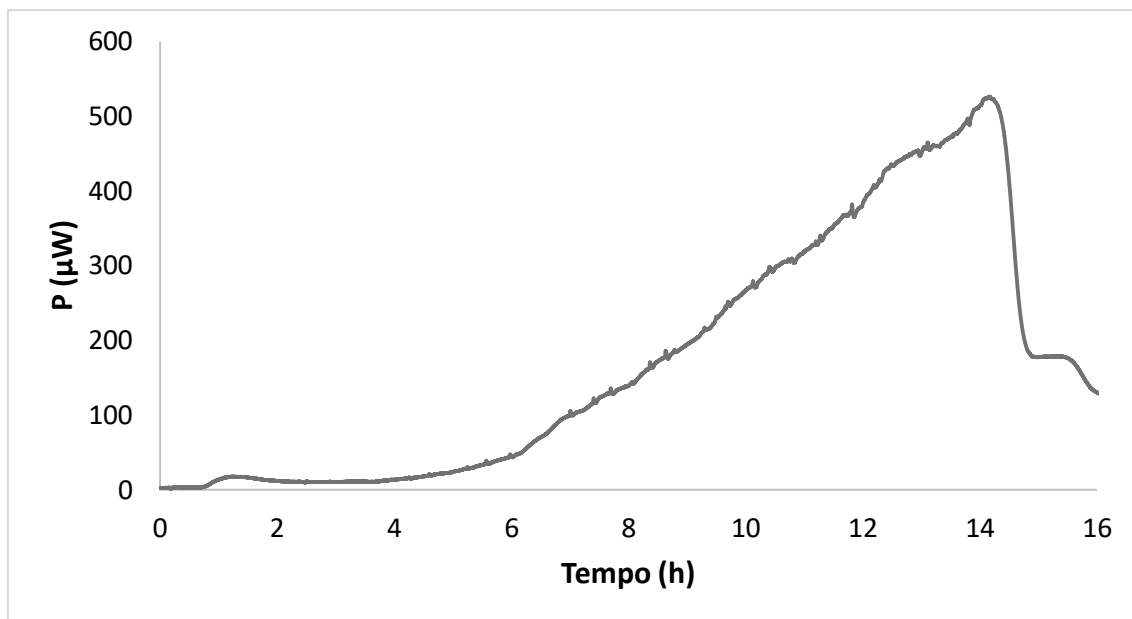
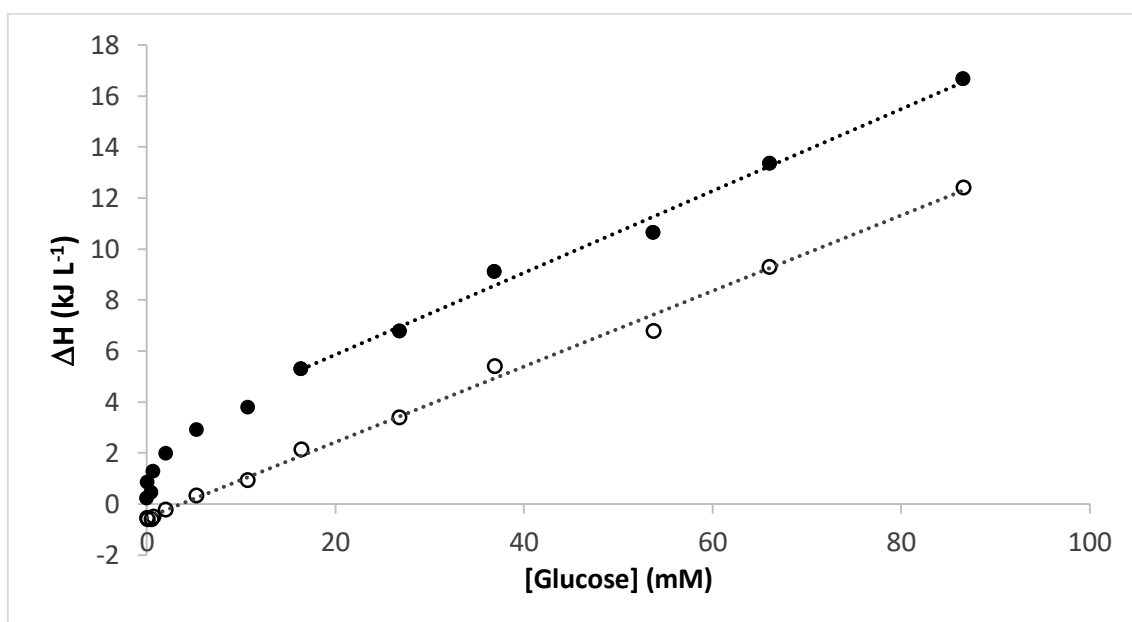


Figura S2 – Gráfico de Arrhenius da reação de hidrólise do metilparabeno em NaOH. As constantes de velocidade (k) da reação de hidrólise do MP às diversas temperaturas foram determinadas através de medidas calorimétricas ao longo do tempo de reação. As barras de erro verticais e horizontais representam o desvio padrão para as respectivas variáveis de n experiências independentes ($n \geq 5$).



*Figura S3 - Curva calorimétrica do crescimento celular de *S. cerevisiae* BY4741 a crescer em meio SC Σaa.*



*Figura S4 – A não-linearidade observada para a entalpia associada à metabolização da glucose no início da exponencial é causada pelo elevado metabolismo respiratório. Representa-se a entalpia associada ao metabolismo da glucose pela *S. cerevisiae* em condições batch em meio SC (●) e a mesma curva de entalpia mas corrigida descontando a entalpia associada à metabolização da glucose por metabolismo respiratório (○). O calor associado ao metabolismo respiratório foi calculado a partir da quantidade de O_2 consumido em mol, multiplicando pelo coeficiente oxalórico para metabolismo respiratório, $466 \text{ kJ mol}^{-1} O_2$ [32].*

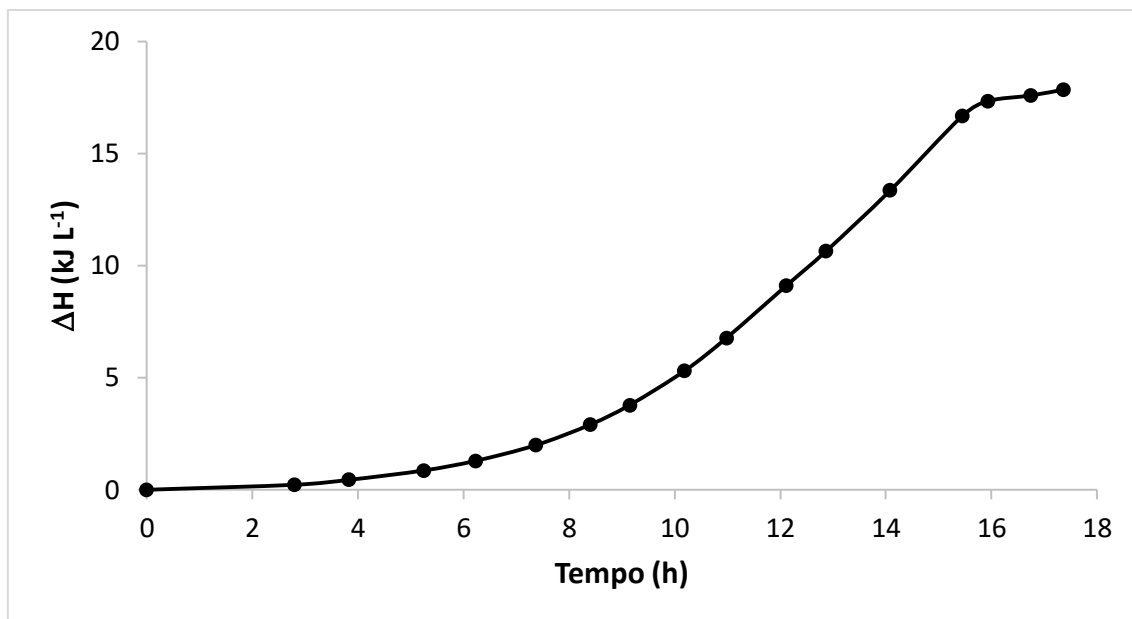


Figura S5 – Perfil de calor cumulativo de uma cultura de *S. cerevisiae* a crescer em meio SC.

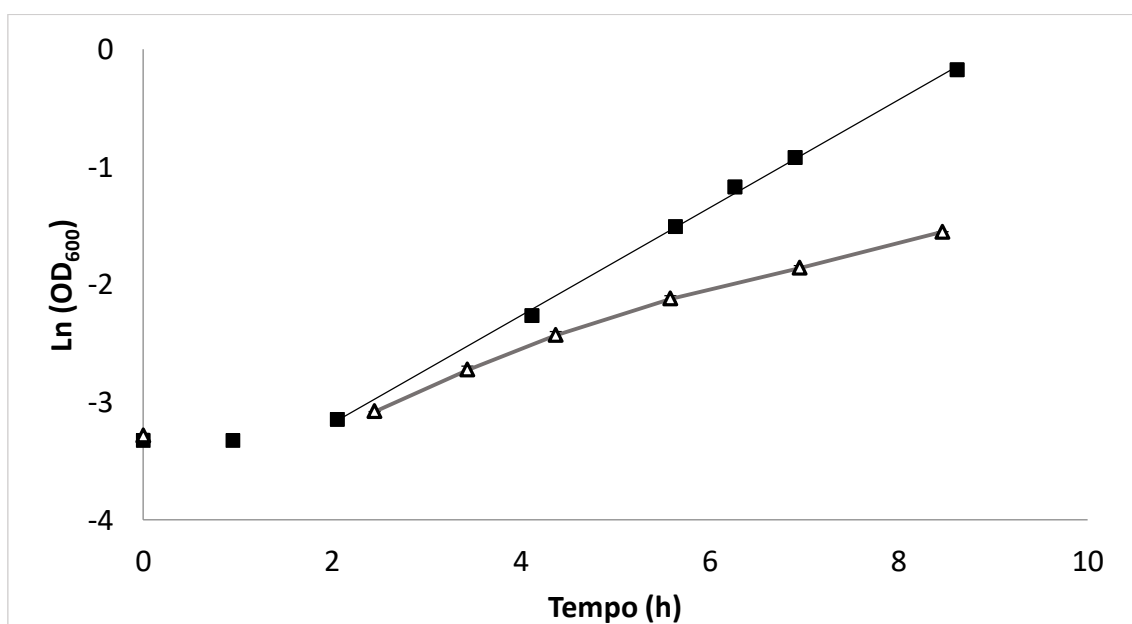


Figura S6 - Taxa de crescimento do mutante *ZWF1Δ* em meio SC ($n=2$, Δ) é inferior à estirpe wt BY4741 (\blacksquare).

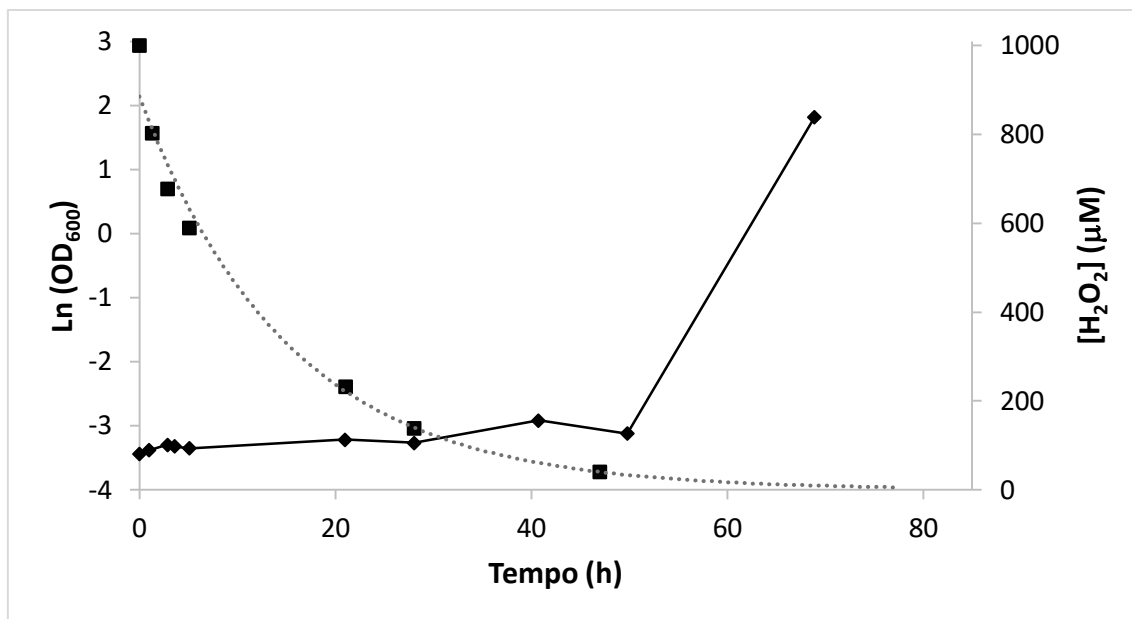


Figura S7 – Perfil de consumo de H_2O_2 pela estipe $ZWF1\Delta$ em meio CAA. As células foram crescidas até aos 0.25 OD_{600} e diluídas 1/10 em meio fresco e 1mM H_2O_2 foi adicionado às células (0h). Representam-se o logaritmo de OD_{600} (♦) e a concentração de H_2O_2 (■) ao longo do tempo.

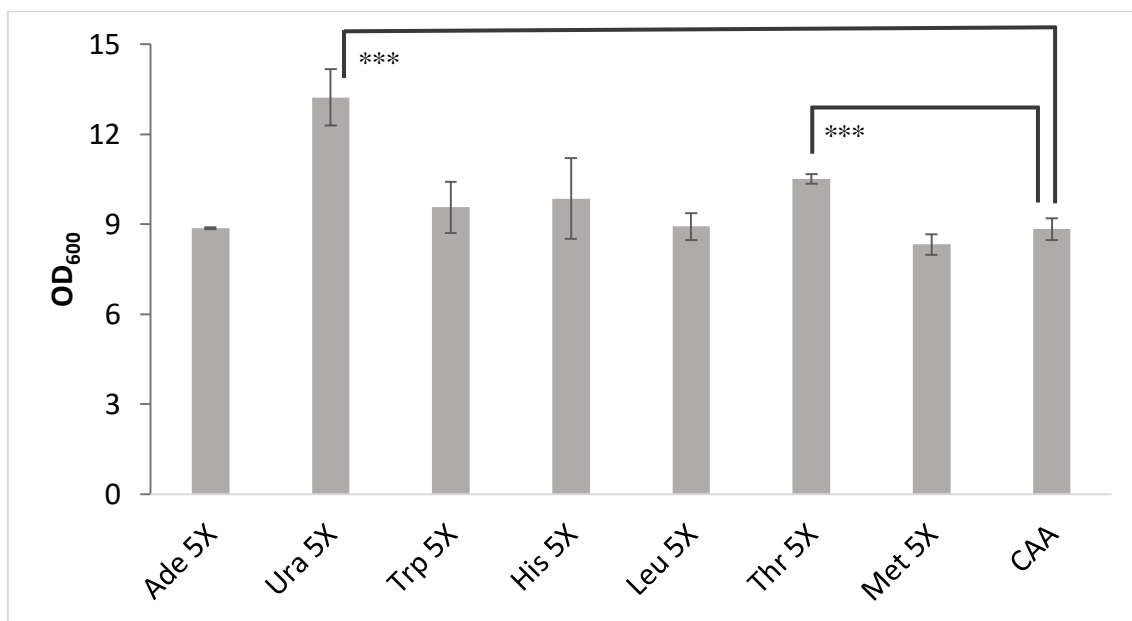


Figura S8 – Efeito da suplementação extra do Meio CAA. Representa-se OD_{600} da *S. cerevisiae* na fase estacionária de diversos meios CAA extra suplementados. Os meios foram preparados adicionando um excesso do aminoácido ou base indicado num excesso de 5x. As barras de erro representam o desvio padrão. Todas as amostras foram feitas, no mínimo em duplicado ($n \geq 2$). ***, p-value < 0.001